

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

Scuola di Scienze

Corso di laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente

**Valutazione del rischio ecologico dei residui di farmaci nel suolo:
analisi sperimentale della tossicità della carbamazepina sul lombrico
*Eisenia andrei***

Tesi di Laurea in Metodi ecologici per l'analisi e la gestione dell'ambiente

Relatore:

Prof. Andrea Pasteris

Presentata da:

Stefano Minardi

Correlatori:

Prof.ssa Elena Fabbri

Dott.ssa Sara Buratti

II Sessione

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1. La matrice suolo	5
1.2. L'inquinamento dei suoli	6
1.3. La contaminazione dei suoli: il caso dei farmaci	8
1.3.1. Nascita della normativa Internazionale e Italiana: le direttive e le linea guida.	9
1.3.2. La carbamazepina	11
1.3.2.1. Caratteristiche chimico-fisiche	11
1.3.2.2. Origine e utilizzazione.....	12
1.3.2.3. Implicazioni sulla salute e sull'ambiente	13
1.3.2.4. Diffusione nell'ambiente	14
1.4. Biomonitoraggio	16
1.5. Bioindicatori.....	17
1.6. Saggi biologici o bioassay	19
1.7. Biomarker	21
1.7.1. Stabilità membrane lisosomiali	24
1.7.2. Accumulo lipofuscine	25
1.7.3. Accumulo lipidi neutri	26
1.7.4. Attività dell'enzima catalasi	27
1.7.5 Attività dell'enzima glutatione S-transferasi (GST)	28
1.7.6 Attività dell'enzima acetilcolinsterasi (AChE).....	29
1.7.7. Concentrazione della Malondialdelide	31
1.8. I lombrichi: organismi utili a valutare la salute dell'ambiente	31
1.8.1. Caratteristiche dei lombrichi.....	32
1.8.1.1. Phylum Annelida.....	32
1.8.1.2. Sottoclasse Oligochaeta.....	33
1.8.1.3. Famiglia Lumbricidae.....	34
1.8.2. Eisenia andrei.....	35

2. SCOPO DELLA TESI.....	38
3.MATERIALI E METODI.....	40
3.1. Principio dell'esperimento.....	40
3.2. Provenienza e preparazione del suolo	40
3.3. Allevamenti.....	41
3.4. Test preliminare.....	42
3.5. Test definitivo	45
3.6. Batteria di biomarker.....	46
3.6.1. Neutral Red Retention Assay	47
3.6.1.1. Estrazione dei celomociti.....	47
3.6.1.2. Preparazione e lettura dei vetrini.....	48
3.6.2. Accumulo lisosomiale di lipofuscine	49
3.6.2.1. Preparazione dei chucks	49
3.6.2.2. Preparazione e lettura dei vetrini.....	49
3.6.3. Accumulo lisosomiale di lipidi neutri	50
3.6.4. Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE)	51
3.6.5. Valutazione dell'attività della catalasi e della glutazione S-transferasi (GST).....	52
3.6.5.1. Attività della catalasi.....	53
3.6.5.2. GST.....	53
3.6.6. Malondialdeide	54
3.7. Analisi statistica dei dati.....	55
4. RISULTATI.....	57
4.1. Test preliminare.....	57
4.2. Test definitivo	59
4.2.1. Stabilità delle membrane lisosomiali	59
4.2.2. Accumulo di lipofuscine	60
4.2.3. Accumulo di lipidi neutri	63
4.2.4. Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi	65

4.2.5. Attività dell'enzima Catalasi	67
4.2.6. Attività dell'enzima Glutathione-S-Transferasi (GST).....	68
4.2.7. Malondialdeide (MDA).....	69
4.2.8. Mortalità	71
4.2.9. Riproduzione	71
4.2.10. Accrescimento.....	74
5.DISCUSSIONE	78
6. CONCLUSIONI.....	80
BIBLIOGRAFIA	83

1. INTRODUZIONE

1.1. La matrice suolo

Il suolo per lungo tempo è stato considerato solamente come un supporto inerte per le numerose forme di insediamento. Si tratta, invece, di un sistema naturale dinamico, che si evolve per azione della particolare combinazione dei fattori geologici, climatici, ecologici ed antropici che caratterizzano una determinata area, e conferiscono al suolo una specifica individualità (ARPA Friuli Venezia Giulia, 2005). Il suolo è difficilmente definibile in modo breve ed esauriente, a causa appunto della sua complessità e della molteplicità dei fenomeni che lo generano e che vi si svolgono. Quando ci si riferisce ad esso si considera lo strato superficiale della crosta terrestre, derivante dall'alterazione di un substrato roccioso, chiamato roccia madre, per azione chimico-fisica e biologica esercitata da tutti gli agenti superficiali e dagli organismi presenti in o su di esso. Una definizione di base è quella di un corpo naturale indipendente, dinamico, costituito da fasi solide, liquide e gassose, situato sulla superficie terrestre, suddiviso in orizzonti e capace di sostenere la vita delle piante (USDA-NRCS, 2003). È caratterizzato da un'atmosfera interna, da una flora e da una fauna propria. (ARPA Emilia-Romagna, 2005). Costituisce un'entità molto complessa, in grado di respirare, di assimilare elementi utili quali il carbonio e l'azoto, di degradare e mineralizzare i composti organici e di accumulare sostanze di riserva sotto forma di humus. Queste funzioni sono dovute all'innomerevole quantità di organismi micro- e macroscopici che popolano il terreno e che intervengono attivamente con il loro metabolismo sulla composizione dello stesso, trasformandolo e rigenerandolo (Nappi, 2000).

Il suolo inoltre rappresenta il mezzo d'interazione tra atmosfera, idrosfera e biosfera. Gli orizzonti nei quali è suddiviso sono costituiti da caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche proprie.

L'importanza del suolo come risorsa vitale, in larga misura non rinnovabile e, quindi, da proteggere, è stata continuamente riproposta con sempre maggiore evidenza a livello nazionale ed internazionale. Nella Comunicazione della Commissione delle

Comunità Europee del 16 aprile 2002 al Consiglio Europeo, al Parlamento Europeo, al Comitato Economico e Sociale e al Comitato delle Regioni, dal titolo “Verso una strategia tematica per la protezione del suolo” si esaminarono funzioni del suolo quali: produrre alimenti, conservare, filtrare e trasformare i minerali, l’acqua, le sostanze organiche, i gas, ecc., essere fonte di materie prime, essere la piattaforma dell’attività umana (Commissione delle comunità europee, 2002). Con l’approvazione della suddetta comunicazione da parte del Consiglio Europeo, si dà il via all’impegno dell’Unione Europea a realizzare in maniera sistematica e completa azioni messe in atto ai fini della protezione del suolo.

Il suolo è un sistema dinamico in equilibrio con gli altri elementi dell’ambiente circostante, che l’uomo può compromettere attraverso le sue attività e comportamenti.

Rispetto all’acqua e all’aria, il suolo appare immobile e spazialmente più eterogeneo. I costituenti dei vari tipi di suolo possiedono una gran capacità di trattenere contaminanti ambientali, specialmente quelli costituiti da molecole apolari o da ioni bi- o trivalenti carichi positivamente; in conseguenza di ciò, esso si comporta come una trappola per gli inquinanti e la loro concentrazione in esso è in genere più alta che in altri comparti ambientali (ANPA, 2000).

1.2. L’inquinamento dei suoli

L’inquinamento del suolo è un fenomeno di alterazione della composizione chimica naturale del terreno causato dall’attività umana.

Questo tipo di inquinamento porta all’alterazione dell’equilibrio chimico-fisico e biologico del suolo, lo predispone all’erosione e agli smottamenti e può comportare l’ingresso di sostanze dannose nella catena alimentare fino all’uomo.

Quando si parla di ambiente molto spesso si citano soltanto aspetti biologici o chimici, ma ci si dimentica che l’ambiente è, prima di tutto, un contenitore fisico costituito dalle rocce e dalle forme in cui esse sono modellate; è, quindi, parte del sistema Terra e ne riflette i complessi equilibri. Esso è una realtà molto complessa, è un insieme di diversi fattori (esseri viventi, caratteristiche ambientali, interventi

umani, etc.) che permettono la vita; in esso anche un minimo cambiamento può causare gravi conseguenze.

Con l'attività umana vengono messe in circolazione alcune sostanze in quantità e concentrazioni così massicce da superare la capacità del Pianeta di diluire queste sostanze.

Tali sostanze come facile intuire vengono rilasciate nelle diverse matrici ambientali: acqua, aria e suoli. In questo paragrafo verrà trattato l'inquinamento nel suolo.

L'inquinamento del suolo è un fenomeno meno conosciuto, meno evidente ed anche meno studiato rispetto all'inquinamento delle acque e dell'aria. La sua minore notorietà è imputabile a diverse ragioni:

- L'inquinamento del suolo ha effetti meno immediati sull'uomo rispetto, ad esempio, all'inquinamento atmosferico;
- L'inquinamento del suolo è meno appariscente rispetto all'inquinamento di un corso d'acqua dovuto a scarichi fognari industriali;
- Il suolo è un ecosistema meno conosciuto e studiato rispetto agli ecosistemi acquatici.

La contaminazione del suolo innescata dall'uomo è causata dalla presenza di, di sostanze chimiche o altre alterazioni nell'ambiente naturale del suolo. Questo tipo di contaminazione deriva in genere dalla rottura di serbatoi sotterranei, dall'applicazione di pesticidi, dalla percolazione di acque superficiali contaminate nel sottosuolo, dalla lisciviazione di rifiuti da discarica e infine dallo scarico diretto di rifiuti industriali al suolo. Le sostanze maggiormente coinvolte sono idrocarburi del petrolio, solventi, pesticidi, metalli pesanti e farmaci (Dalla Marta Anna., 2010).

L'immissione di queste sostanze nel suolo porta poi a diversi effetti nella matrice suolo: un primo effetto è una contaminazione generale dovuta all'immissione nel suolo di sostanze tossiche e persistenti, che possono entrare nelle catene alimentari e dare origine a fenomeni di bioaccumulo. Un secondo effetto è il trasferimento dell'inquinamento dovuto a tali sostanze dal suolo alle falde acquifere, con evidenti rischi per la salute umana. Un ultimo effetto ma non di meno importanza è l'alterazione dell'ecosistema suolo con annessa perdita di biodiversità, potenziale perdita o riduzione della fertilità per organismi e infine una forte riduzione del potere auto depurante della matrice (Dalla Marta Anna., 2010).

1.3. La contaminazione dei suoli: il caso dei farmaci

I farmaci ed i loro residui presenti in ambiente sono considerati contaminanti “emergenti”, il termine emergente non è utilizzato con un’accezione temporale in quanto è noto da almeno 20 anni che queste sostanze sono presenti in ambiente. Il termine “emergente” piuttosto è utilizzato per distinguerli dagli inquinanti convenzionali (ad es. metalli come mercurio, piombo, etc.) o da quelli che sono stati definiti ‘contaminanti prioritari’ (DDT, PCB, PAH, etc...) e sui quali è stata posta un’enorme attenzione da parte dell’opinione pubblica, delle associazioni ambientaliste e degli organi legislativi competenti (Daughton and Ternes, 1999).

Come citato nel paragrafo precedente tra gli xenobiotici maggiormente presenti in ambiente e che possono potenzialmente contaminare i suoli ci sono i farmaci.

Diversi studi recenti hanno documentato che le acque reflue provenienti da impianti di depurazione cittadina contengono una svariata varietà di prodotti farmaceutici. In particolare uno studio effettuato in Colorado ha mostrato che l’uso irriguo di acque provenienti da tali impianti comporta l’accumulo e la presenza di farmaci nel suolo. (Kinney, CA, Furlong, ET, Werner, SL, e Cahill, JD, 2006).

Come ci si aspetta, i farmaci sono molto concentrati nelle acque reflue degli ospedali, tuttavia la percentuale di farmaci provenienti dagli ospedali è stata valutata complessivamente non oltre il 20% del quantitativo totale.

L’origine preponderante dei farmaci proviene dall’uso domiciliare, per cui gli impianti municipali di raccolta delle acque di rifiuto sono la maggiore via di ingresso in ambiente. Una volta ingeriti e metabolizzati, i farmaci vengono escreti via urine o feci e introdotti nella rete fognaria fino alle sedi di trattamento delle acque. Altra sorgente è rappresentata dalle manifatture dei farmaci, dalle quali possono derivare scarichi illegali o accidentali. Una sorgente importante di farmaci, soprattutto di antibiotici, è rappresentata dagli allevamenti animali, sia in ambienti interni che al pascolo, e dall’acquacoltura. Nel primo caso in particolare vengono prodotti e raccolti una grande quantità di rifiuti, che di solito sono accumulati temporaneamente e poi dispersi sui suoli agricoli. I farmaci presenti nei suoli possono essere trasportati alle acque sotterranee, o dilavati a livello superficiale

contribuendo ad aumentare il livello di farmaci nei corsi d'acqua oppure una volta sciolti nell'acqua interstiziale possono essere assunti dai vegetali. Gli impianti di depurazione attuali non sono pianificati per eliminare tutti i tipi di microinquinanti come ad esempio i farmaci, e in relazione alle differenti molecole l'eliminazione può essere in percentuale diversa, spesso anche molto bassa.

Ricapitolando le possibili vie d'ingresso dei farmaci nei suoli sono:

- Scarichi ospedalieri
- Scarichi industriali
- Scarichi urbani
- Deiezioni animali
- Acquacoltura

1.3.1. Nascita della normativa Internazionale e Italiana: le direttive e le linea guida.

Nel corso degli anni si sono evolute numerose normative riguardanti l'inquinamento del suolo, proprio in quanto le preoccupazioni sorte in molti Stati per il degrado dell'ambiente hanno contribuito a richiamare l'attenzione dell'opinione pubblica mondiale su questo problema. Nel 1972 le Nazioni Unite promossero una Conferenza a Stoccolma con lo scopo di stabilire indirizzi tecnici e normative pronti a ridurre l'inquinamento ambientale, a seguito della quale si misero in moto una serie di ricerche e si generò un'importante industria per i processi di purificazione e di smaltimento anche per contaminati quali i farmaci.

Qui di seguito riporto alcune norme riguardanti gli inquinanti del suolo, limiti e obblighi, attuate in Italia:

- D.Lgs 22/97: Decreto "Ronchi" sui rifiuti;
- DM 471/99: Decreto applicativo della messa in sicurezza, caratterizzazione e bonifica di un sito contaminato.

- Testo unico Ambientale D.lgs. 152/2006 aggiornato al 10 Febbraio 2012 parte III “Norma in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione”.

In ambito Europeo invece l'ente EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) insieme al CVMP (Committee for Veterinary Medicinal Products) e VICH (International Co-operation on Harmonization of Technical Requirements for Authorization of Veterinary Medicinal Products) hanno emanato linee guida riguardanti i limiti massimi di concentrazione di farmaci ad uso veterinario in suolo. Tali rapporti si basano sul calcolo del quoziente di rischio definito come rapporto, per le singole sostanze, tra le concentrazioni in suolo previste o misurate (PEC) e le concentrazioni di non-effetto (PNEC). Tali valutazioni fanno in parte riferimento ai principi generali definiti dalla Commissione Europea per l'effettuazione della valutazione del rischio per l'ambiente e per l'uomo (Technical guidance documents).

In particolare tre di queste interessano il mio caso di studio:

- *EMEA/CVMP/055/96*
- *CVMP/ VICH /592/98 (ECOTOXICITY PHASE I)GUIDELINE ON ENVIRONMENTAL IMPACT ASSESSEMENT (EIAS) FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS -PHASE I)*
- *CVMP/ VICH 790/03 (ENVIRONMENTAL IMPACT ASSESSEMENT (EIAS) FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (VMPs) -PHASE II*

La produzione dei farmaci, il loro trasporto, la loro escrezione dopo il consumo e lo smaltimento di quelli non utilizzati rappresentano un problema ambientale. L'escrezione dopo il consumo può determinare la diffusione di principi attivi o metaboliti attivi prodotti (quali carbamazepina) espulsi in forma attiva e stabile, di farmaci citotossici che possono avere metabolismi reattivi, di sostanze attive sul sistema endocrino (estrogeni, ormoni tiroidei ecc.).

Dagli anni '90 ad oggi, l'Autorità regolatoria ambientale degli Stati Uniti (United States Environmental Protection Agency - US EPA) ha dedicato molte risorse per approfondire il problema. Le principali strutture coinvolte sono l'Office of Research and Development's (ORD) e il National Exposure Research Laboratory (NERL).

A partire dal 2001, l'Unione Europea ha supportato importanti attività di ricerca mirate ad identificare la qualità e la quantità dei residui di sostanze farmaceutiche nel suolo, nelle acque superficiali e nelle acque reflue urbane di impianti di

depurazione, con lo scopo di valutare se e quali rischi esistono per la salute umana e per l'ambiente. Nello specifico è stato avviato il gruppo di progetti "Pharma" che si compone delle 3 ricerche "Rempharmawater", "Poseidon" e "Eravmis". Tutto ciò ha coinvolto 13 nazioni, tra cui l'Italia.

Alcuni Paesi del Nord Europa, in particolare la Svezia, la Danimarca e la Germania, hanno studiato quale impatto hanno i farmaci sull'ambiente e sulla nostra salute. L'Associazione Svedese dei Medici per l'Ambiente (SLFM) ha pubblicato su questa tematica il rapporto "I farmaci e l'ambiente. Cosa conosciamo oggi?", rivolto a medici, autorità pubbliche, giornalisti e case farmaceutiche interessati agli effetti che i farmaci possono avere nell'ambiente (ISDE 11 Giugno 2010).

Per l'OMS farmaco è "qualunque sostanza usata allo scopo di modificare o studiare funzioni fisiologiche o stati patologici a beneficio di chi la riceve".

L'approvazione all'utilizzo di un farmaco avviene, nella maggior parte dei casi, in accordo con le legislazioni internazionali. I medici ed i veterinari contribuiscono alla loro diffusione, ma non sempre hanno chiari gli effetti che i farmaci possono avere nell'ambiente, anche nella quota che rimane inutilizzata per scadenza o altro.

1.3.2. La carbamazepina

1.3.2.1. Caratteristiche chimico-fisiche

La carbamazepina (5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carbossammide) è una molecola insolubile in acqua (17.7 mg/l at 25 C), molto stabile ai processi fotolitici e scarsamente biodegradabile. Possiede un valore di Log KOW pari a 2.45 (indice di una mediocre adsorbibilità su fase solida) e tende a presentarsi in forma prevalentemente indissociata nei comparti acquatici (pKa di 0.37) (Snyder et al., 2007)

La struttura molecolare e le altre caratteristiche della molecola di carbamazepina sono riassunte nella seguente tabella (figura 1):

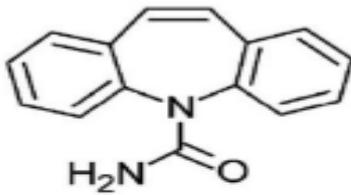
Carbamazepina	
Struttura	
Formula Chimica	$C_{15}H_{12}N_2O$
MW [g mol⁻¹]	236.3
Solubilità [mg L⁻¹]	18
Log Kow	2.45
pKa	0.37

Fig. 1: caratteristiche chimiche della carbamazepina.

1.3.2.2. Origine e utilizzazione

Commercializzata a partire dagli anni Sessanta, la carbamazepina è un analgesico anticonvulsivante, specifico per nevralgia del trigemino ed è uno dei principali farmaci usati nel trattamento dell'epilessia. Deriva chimicamente da farmaci antidepressivi triciclici a struttura dibenzo-azepinica, e venne scoperta nel corso dello screening di molecole in grado di inibire la crisi indotta dalla stimolazione elettrica nel topo.

L'assunzione di carbamazepina comporta un assorbimento rapido nel sangue dove è strettamente legata alle proteine: le dosi mediche variano tra gli 8 e 10 mg/L; valori superiori a 12 mg L⁻¹ sono ritenuti tossici. Tale composto viene somministrato singolarmente o in combinazione con altri farmaci antiepilettici: interazioni con altri medicinali, nonché differenze individuali nell'assorbimento e nel metabolismo possono causare risposte molto variabili (Cunningham et al., 2010).

Dalle ricerche bibliografiche (2001-2007) di numerose fonti analizzate nello studio di Zhang et al. (2008) è riportato un consumo annuo globale di carbamazepina pari a 1014 tonnellate.

La sua azione più nota a livello del sistema nervoso è quella di diminuire la cinetica di riattivazione dei canali del sodio voltaggio dipendenti per blocco della porta

d'inattivazione del canale di Na, riducendo così la scarica ripetitiva ad alta frequenza dei potenziali d'azione della fibra nervosa.

Possiede inoltre effetti metabolici importanti: interferisce con il ciclo degli inositoli, strutture importanti nell'equilibrare i livelli di testosterone negli organismi e interferisce con la GSK-3 (glicogeno sintasi-chinasi 3) enzima chiave nella formazione del glicogeno. La carbamazepina è efficace, oltre alla terapia epilettica, anche nel trattamento del dolore di origine neurologica come, ad esempio, la nevralgia del trigemino; nella nevralgia glossofarinea e in altre sindromi dolorose quali la sclerosi multipla. Il farmaco inoltre possiede anche proprietà anticolinergiche, antidiuretiche, antiaritmiche, antidepressive, sedative e bloccanti neuromuscolari (António. et al; 2002).

Alcuni studi hanno evidenziato un possibile ruolo terapeutico del farmaco anche nel trattamento di alcuni disordini psichiatrici tra cui la sindrome depressiva bipolare; la Carbamazepina, infatti, ha indotto risposte terapeutiche in pazienti maniaco-depressivi nei quali il litio non era stato efficace (Dilsaver et al. 1996).

Possiede alcuni effetti simili alla fenitoina e, come questa, inibisce le convulsioni indotte da elettroshock. Come la fenitoina, la carbamazepina riduce la trasmissione sinaptica di tipo tetanico a livello del midollo spinale. Il farmaco antagonizza i recettori dell'adenosina; tale effetto sembra però essere più correlato ai suoi effetti antidepressivi che a quelli anticonvulsivanti. Come farmaco antidolorifico, la carbamazepina inibisce la trasmissione sinaptica a livello del nucleo trigeminale.

1.3.2.3. Implicazioni sulla salute e sull'ambiente

Durante le fasi di ricerca e sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici, le autorità di regolamentazione verificano mediante un'analisi rischio-beneficio la sicurezza dei medicinali per i pazienti, ammettendo un rischio accettabile (effetti collaterali) in previsione dei benefici terapeutici del trattamento. Sebbene tale approccio possa assumere rilevanza in ambito medico, esso perde di significato per un'esposizione accidentale ai prodotti farmaceutici, ad esempio, attraverso l'acqua potabile o con il consumo di alimenti prelevati da ambienti acquatici contaminati.

Gli effetti indesiderati connessi all'assunzione di Carbamazepina comprendono vertigini, sonnolenza, instabilità, nausea, vomito e atassia. Di tanto in tanto si osservano reazioni cutanee allergiche e orticaria.

Tale composto è inserito nelle FDA Pregnancy Categories (come farmaco con evidenza di rischio fetale umano, ma le cui prestazioni in certe situazioni possono consentirne un utilizzo per donne in gravidanza).

La Carbamazepina è non mutagena in vitro e in vivo in una varietà di test inclusi colture di linfociti, inoltre non presenta rischi cancerogeni e non ha propensioni alla bioaccumulazione negli organismi. Le poche valutazioni di rischio espositivo attraverso l'acqua potabile suggeriscono un valore guida intorno a 200 µg L⁻¹, comunque molto superiore alle concentrazioni riscontrate normalmente nelle acque potabili. Effetti secondari connessi ad un potenziale effetto estrogenico di tale molecola non sono stati ad oggi approfonditi con sufficiente dettaglio dalla comunità scientifica internazionale (Cunningham et al., 2010).

1.3.2.4. Diffusione nell'ambiente

Da un dettagliato rapporto sulla qualità delle acque europee e americane emerge quanto segue: su un totale di 2046 fonti di acque superficiali le concentrazioni di carbamazepina in Europa variano da livelli inferiori al limite di rilevabilità (1-30 ng L⁻¹) sino a valori massimi di 11.6 µg L⁻¹, mentre per i corpi idrici di Canada e Stati Uniti si osservano delle variazioni da alcuni ng L⁻¹ sino a 1.5 µg L⁻¹ (Cunningham et al., 2010).

Dati sul territorio italiano riportano per le acque del fiume Po livelli di carbamazepina compresi in un intervallo tra 126 e 182 ng L⁻¹ per lo studio di Pojana et al. (2011) e con concentrazioni di 20 ng L⁻¹ in Loos et al. (2010).

La carbamazepina è nota inoltre per la sua forte persistenza nell'ambiente acquatico e per la sua grande resistenza alla degradazione biologica negli impianti di depurazione, perciò si ritrova ubiquitariamente nella matrice acquatica. Tale composto ha poi evidenziato, da diversi studi sperimentali, un'emivita di degradazione anche superiore ai 100 giorni. In merito alla persistenza, si evidenzia inoltre che la sostanza, essendo progettata per essere somministrata per via orale,

non è sensibile ai processi di degradazione per idrolisi chimica o mediata da enzimi, che in ambiente acquatico rappresenta una delle principali vie di degradazione degli xenobiotici. Negli scarichi dai depuratori delle acque reflue la carbamazepina varia tra 500 e 3000 ng L⁻¹, mentre in acque superficiali tale intervallo si riduce tra 2 e 500 ng L⁻¹. È stata rinvenuta anche in acque sotterranee, con concentrazioni tra 20 e 135 ng L⁻¹ (Zhang et al., 2008). Nelle acque potabili il farmaco è stato rilevato in un range da 0.8 a 258 ng L⁻¹ (Cunningham et al., 2010).

Il quadro che emerge da gli innumerevoli dati disponibili prelevati da studi sperimentali sul farmaco è quello di una contaminazione diffusa del patrimonio idrico che interessa gran parte dei Paesi Industrializzati. Tra l'altro, è interessante accennare al fatto che la presenza del farmaco nelle acque superficiali non mostra fluttuazioni stagionali, come nel caso dei prodotti fitosanitari. Essa sembra invece mostrare un andamento costante a causa delle continue immissioni, configurando, specie per gli organismi acquatici, un problema di esposizione multipla e a lungo termine a bassi livelli del composto. Per quanto riguarda il rischio di esposizione indiretta dell'uomo va sottolineato il fatto che l'assunzione per tempi prolungati del farmaco, o attraverso il consumo di acqua potabile o attraverso il contatto con acque di irrigazione, può portare ad effetti nocivi correlati alla tossicità epatica.

Come si può rilevare parlando di matrice acqua il dato è ricavabile da molto studi, mentre al contrario per quanto riguarda la matrice suolo gli studi effettuati sono ancora agli albori e si sta cominciando a rilevare l'interazione del farmaco con il suolo da poco. Difatti troviamo due studi recenti che accertano la presenza della carbamazepina in tale matrice.

Il primo caso studio è stato effettuato su un campione di suolo in cui erano impiantate piante di cetriolo. Infatti sono state convogliate acque reflue urbane, con rilevanti concentrazioni di carbamazepina, su questa piantagione. Analisi successive hanno rilevato alte concentrazioni del farmaco nelle foglie e i frutti della pianta (76–84% assorbimento nella pianta) (Moshe Shenker, Daniella Harush, Julius Ben-Ari, Benny Chefetz, 2011).

Il secondo studio effettuato a Tel Aviv è stato svolto su sette sottosezioni di suolo che comprendeva i primi 150 cm della matrice. Le sette sottosezioni erano tutte a contatto con bacini di depurazione di acque reflue urbane e ospedaliere. Dai dati pervenuti è stato rilevato che alti contenuti di carbamazepina (1094 ± 166 ng/L) si concentravano principalmente nei primi strati superiori dei suoli, ciò è spiegabile

perché alti contenuti di sostanza organica, facilmente “legabili” al gruppo ossidrilico presente nella carbamazepina, sono presenti nei primi strati superficiali (Gilboa Arye et al., 2010).

Questi due risultati vanno presi in seria considerazione in quanto dimostrano come la carbamazepina e altri farmaci presenti nelle acque, possano entrare a contatto con la matrice suolo e a loro volta accedere alla catena trofica.

1.4. Biomonitoraggio

Il termine biomonitoraggio implica valutare gli effetti complessivi di uno o più contaminanti in specifiche aree o siti. È opportuno precisare che questo studio tratta di un test sub cronico che vuole indagare sugli effetti specifici di una sostanza ovvero la carbamazepina su organismi sentinella.

Nel nostro caso infatti ci siamo concentrati sull'effetto del farmaco appositamente aggiunto ad un suolo “pulito”. Il fatto che il suolo provenisse da un particolare sito non implica che noi volessimo dare una valutazione di quello specifico sito ma vuole suggerire che i risultati dello studio ottenuti possono avere implicazioni per eventuali biomonitoraggi futuri di suoli contaminati dalla sostanza presa in esame.

La valutazione della qualità del suolo è essenziale per una corretta gestione ambientale. Come avviene anche per altri comparti ambientali, il monitoraggio chimico-fisico, fornisce dati di tipo quantitativo in termini di concentrazione dei singoli inquinanti ma non è in grado di valutare la biodisponibilità dei contaminanti. Il monitoraggio biologico o biomonitoraggio invece permette di stimare gli effetti biologici dell'inquinamento; cioè fornisce informazioni più generali dello stato di salute dell'ambiente, valutando i danni subiti da bioindicatori naturalmente presenti nell'area di studio o appositamente introdotti, oppure da organismi esposti in laboratorio a campioni prelevati dall'area di studio (Donnini., 2009).

Valutare gli effetti causati dagli inquinanti di origine antropica su un ecosistema rappresenta un problema di non facile risoluzione. Questo perché gli organismi possono avere molteplici vie di assunzione per i vari composti inquinanti. Inoltre le

componenti chimico–fisiche, quali la temperatura, il pH ed il potenziale redox, che caratterizzano ogni ecosistema influiscono sull'efficienza della via d'assunzione.

Inoltre, gli organismi tendono ad accumulare più inquinanti contemporaneamente e queste sostanze di conseguenza possono generare diverse interazioni biochimiche, tossicologiche fra di loro, provocando all'organismo una risposta cumulativa.

Il monitoraggio ambientale ha lo scopo quindi di analizzare le eventuali variazioni che intervengono nell'ambiente a seguito di uno stress o di origine naturale o antropica, risalendo alle loro cause.

1.5. Bioindicatori

Pur nella diversità di sfumature, la maggior parte degli autori concordano nel paragonare il bioindicatore a una sorta di raffinato e complesso strumento in grado di evidenziare le variazioni ambientali.

Divergenze si riscontrano invece riguardo alla natura del bioindicatore. Per alcuni questo è soprattutto un organismo, normalmente identificato a livello di specie, o a livelli sistematici sovra specifici (genere, famiglia); per altri, anche le popolazioni, le comunità o il paesaggio, nel loro strutturarsi nel tempo e nello spazio, possono essere assunti come bioindicatori; infine, per altri autori ancora, il ruolo di indicatore biologico può essere svolto anche da parti del corpo di un organismo. Ovviamente, dalla diversa interpretazione della natura del bioindicatore discende anche il diverso modo di definire le risposte da considerare come segnali utili per la valutazione biologica.

In questo lavoro viene presa come riferimento la definizione di bioindicatore proposta da Iserentant e de Sloover (1976) i quali definiscono bioindicatore un organismo o sistema biologico usato per valutare una modificazione, generalmente degenerativa, della qualità dell'ambiente, qualunque sia il suo livello di organizzazione e l'uso che se ne fa. Secondo i casi il bioindicatore sarà una comunità, un gruppo di specie con comportamento analogo (gruppo ecologico), una specie particolarmente sensibile (specie indicatrice), oppure una porzione di

organismo, come organi tessuti di cellule o anche una soluzione di estratti enzimatici.

I requisiti di un buon bioindicatore variano con la natura dello stesso, con il tipo di risposta che è in grado di esprimere, con il tipo e la durata dell'alterazione ambientale che si intende rilevare.

Un parametro irrinunciabile è l'accertata sensibilità nei confronti di una azione perturbatrice, chiaramente identificata rispetto a tutta una serie di stress ai quali l'indicatore è costantemente sottoposto; sensibilità che può esprimersi con un'ampia gamma di risposte: alterazione biochimica e fisiologica, disturbo dei bioritmi, modificazione anatomico – morfologica, variazione della composizione della biocenosi per la morte di individui e di specie sensibili, fino alle trasformazioni territoriali che hanno effetti diretti sul paesaggio, sulle sue forme e sul suo funzionamento.

Il tipo di risposta del bioindicatore varia in relazione al livello di organizzazione biologica del sistema e al tempo di esposizione alla causa che provoca lo stress e la conseguente risposta.

I tipi di bioindicatori, le modalità diversificate di risposta e le condizioni ambientali da rilevare permettono una vasta scelta di uso. I bioindicatori di basso livello di organizzazione biologica, sono soprattutto usati come sensori e con le metodiche di un vero e proprio strumento di rilevamento.

I bioindicatori nati in natura, danno invece informazioni di massima che devono essere rilevate da un operatore adeguatamente addestrato, in quanto il segno di risposta potrebbe essere mascherato, esaltato o depresso dalla concomitante eventuale presenza di altre azioni più o meno occulte di stress ambientale, non direttamente collegate con quella che si intende rilevare.

Infine, quando l'indicatore biologico si comporta anche da bioaccumulatore, perché accumula in parti vecchie o morte del suo corpo la sostanza inquinante, le informazioni deducibili possono essere anche di tipo storico.

I bioindicatori sono stati presi come oggetto di studio perché offrono numerosi parametri utili per valutare la qualità ambientale, per comprendere gli effetti di determinati inquinanti e per programmare poi eventuali piani di risanamento.

Un buon bioindicatore, perché dia una risposta attendibile, deve possedere alcune caratteristiche basilari quali:

- essere rilevante a livello ecologico;
- essere ampiamente distribuito;
- essere di facile reperibilità stagionale;
- esibire risposte misurabili e quantificabili agli inquinanti;
- avere sensibilità nota nei confronti di un'azione perturbatrice, identificata attraverso una serie di stress quali; alterazione biologica, fisiologica, morfologica ecc.

I test che utilizzano le sentinelle ambientali o bioindicatori hanno differenti livelli di organizzazione. Troviamo alti livelli di organizzazione che forniscono risposte rilevanti riguardo al danno ambientale, ma che sono sensibili solo a stress elevati che già determinano effetti enormemente negativi sul ciclo vitale degli organismi; e bassi livelli di organizzazione che pur non fornendo risposte sullo stato di salute di un ecosistema forniscono informazioni sugli effetti sull'organismo a livelli di esposizione più bassi ed in tempi più brevi.

1.6. Saggi biologici o bioassay

Uno dei possibili strumenti utili per un buon biomonitoraggio consiste nell'uso di saggi biologici o bioassay con protocollo definito su organismi bioindicatori. Questo tipo di approccio è usato oltre che nei monitoraggi ambientali anche per valutazioni della tossicità di specifiche sostanze e del rischio associato al loro uso. Questa tecnica prevede che organismi viventi (allevabili o reperibili sul campo) siano posti a contatto per un determinato tempo ed in condizioni controllate ad un campione ambientale (acqua, suolo, sedimento o altre matrici) di cui si vuole valutare la risposta sugli organismi. Quindi un saggio biologico è una prova di laboratorio in cui un sistema biologico viene esposto alla matrice da analizzare per un determinato periodo di tempo trascorso sul quale vengono valutati gli effetti a carico del sistema biologico stesso. I saggi biologici, oltre alla loro applicazione nel biomonitoraggio, sono anche utilizzati per valutare la tossicità di singole sostanze o di specifiche miscele, anche prima che vengano effettivamente immessa nell'ambiente. Sono

quindi uno strumento utile nella valutazione predittiva del rischio associato all'utilizzo delle sostanze, oltre che nella valutazione a posteriori degli effetti della contaminazione ambientale (Minardi., 2009).

Il sempre maggior utilizzo di questa tecnica è dovuto al fatto che i saggi biologici hanno dimostrato una notevole efficacia, ed infatti tramite essi possiamo:

- valutare gli effetti tossici della frazione biodisponibile dei contaminati
- ricavare risposte integrate sulle conseguenze di effetti sinergici, antagonisti ed di sostanze presenti nella matrice saggiata ma non analizzate dal punto di vista chimico
- ottenere risultati che possono integrarsi coi dati relativi alle analisi chimiche.

Le specifiche risposte o endpoint misurate nel saggio dipendono dalla specie in esame e dalla durata dell'esposizione che comprende parametri del ciclo vitale; quali la mortalità, accrescimento, fecondità, comportamento e anomalie morfologiche.

I bioassay sono classificati in base alla durata di esposizione e in base alle conseguenti risposte.

Si distinguono dunque saggi acuti, se il tempo di esposizione dell'organismo è breve rispetto al suo ciclo vitale, saggi cronici, se invece il tempo di esposizione è una frazione rilevante del ciclo di vita e saggi sub cronici che sono una via di mezzo tra i due.

Nella seconda classificazione si ha una distinzione in bioassay letali, dove la risposta considerata è la mortalità e in bioassay sub-letali che valutano altri tipi di risposta come accrescimento, alterazione comportamentali e riproduzione.

Per la valutazione dello stato di qualità dei suoli sono stati messi a punto diversi protocolli standardizzati (ISO, OECD, ecc) che prevedono l'impiego di invertebrati terrestri. In particolare uno degli organismi più utilizzati è il lombrico *Eisenia andrei*, ritenuto altamente idoneo per l'impiego come bioindicatore (Bettinetti et al., 2008).

1.7. Biomarker

Negli ultimi decenni i biomarker si sono sviluppati come un elemento innovativo nell'ambito delle indagini eco-tossicologiche, rispondendo in maniera rapida e precisa a quesiti basilari come: quali sono gli effetti che i contaminanti provocano a livello molecolare, biochimico, cellulare o di tessuto su popolazioni e/o comunità naturali? La corretta valutazione di questi effetti può rappresentare un segnale precoce dello stress provocato dalla contaminazione ambientale? (Fossi e Casini., 2008)

L'idea di utilizzare questo tipo di approccio si è manifestata per la prima volta con le ricerche pionieristiche di Bayne et al. (1976) e Payne (1977). Negli ultimi due decenni, questo tipo di metodo è stato utilizzato in una vasta gamma di situazioni ambientali, ed i risultati sono documentati in numerose pubblicazioni scientifiche (McCarthy e Shugart 1990; Peakall,1992; Huggest et al., 1992; Peakall e Shugart, 1993; Fossi e Leonzio, 1994; Walker et al., 1996; Fossi, 2000).

Depledge (1994) definisce come biomarker ecotossicologico: “quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica, o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti”.

La grande novità di questo approccio metodologico, rispetto alle metodologie classiche della tossicologia ambientale, è quello di trovare fondamento sul concetto dell'intercorribilità degli effetti di un contaminante ai vari livelli di complessità strutturale. L'obiettivo di tale monitoraggio è infatti quello di stimare (strumento “diagnostico”), prevedere (strumento “prognostico”) e, di conseguenza, intraprendere azioni per evitare eventi inaccettabili a livello ecologico, come l'insuccesso riproduttivo o l'incremento della mortalità nell'ambito di una popolazione attraverso l'utilizzo di “segnali precoci” di esposizione o effetto (McCarthy & Shugart, 1990).

In sintesi l'utilizzo di biomarker permette in primo luogo di “diagnosticare”, attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione sistemi detossificanti, inibizioni enzimatiche, formazioni prodotti metabolici ecc) il tipo e/o i tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è sottoposto. Successivamente, in

funzione dell'intercorrelabilità degli effetti ai vari livelli di complessità strutturale, "prognosticare" e quindi prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine anche su scala ecologica. Il ruolo dei biomarker nelle indagini ecotossicologiche non è quindi di dare informazioni "quantitative" sui livelli di esposizione di un organismo ad un determinato contaminante, ma quello di fornire indicazioni sullo stato di salute come segnale potenziale di alterazioni ai più alti livelli ecologici (Peakall e Shugart, 1993; Fossi e Leonzio, 1994; Fossi, 1998, 2000).

I biomarker correttamente applicati in un programma di biomonitoraggio sono in grado di:

- Fornire una risposta "integrata" dell'esposizione complessiva della specie indicatrice, considerando la sommatoria sia delle diverse vie di assunzione che dell'esposizione nel tempo entro un determinato "range" spaziale.
- Dare un segnale "integrato" dell'insieme delle interazioni tossicocinetiche della miscela di composti a cui è sottoposto l'organismo.
- Fornire una risposta immediata all'esposizione al tossico (ore-giorni); questo dato permette di prevedere l'effetto negativo a lungo termine.
- Fornire indicazioni sulla suscettibilità inter - ed intra-specifica ad un contaminante.

L'applicazione di questo approccio metodologico nei programmi di biomonitoraggio deve tenere conto però della presenza di alcuni fattori "di disturbo" che possono alterare, in una certa misura, il segnale fornito dai biomarker. La conoscenza però dei cicli riproduttivi della specie bioindicatrice e delle sue caratteristiche fisiologiche permette, con un adeguato programma di campionamento, di eliminare totalmente o in parte tali fattori di disturbo.

Inoltre la presenza in certi casi di un'elevata variabilità interindividuale nella risposta dei biomarker verso uno stesso livello di esposizione, può rappresentare, se non correttamente interpretato, un fattore di disturbo nella comprensione dei dati statistici.

In accordo con NRC (1987) , WHO (1993), i biomarkers possono essere suddivisi in tre classi:

- Biomarker di esposizione: forniscono segnali di esposizione ad un agente chimico da parte di un organismo, una popolazione, o una comunità (Deplege,

1994) coprendo l'identificazione e la misura dell'esposizione interna o dose ad un composto chimico (Peakall et al., 1999)

- Biomarker di effetto o stress: forniscono segnali che un organismo, popolazione o una comunità è stata influenzata (solitamente negativamente) da uno o più inquinanti, non necessariamente fornisce informazioni sulla natura dell'inquinante o dell'agente di stress al quale l'organismo è stato sottoposto (Deplege, 1994). Sono incluse le misure di sostanze endogene o parametri che indicano un cambiamento biologico in risposta ai composti chimici, come alterazioni degli enzimi nei tessuti e nei fluidi corporei (Peakall et al., 1999).
- Biomarker di suscettibilità indicano l'abilità intrinseca o acquisita di un organismo di rispondere agli effetti di esposizione ad una specifica sostanza xenobiotica, includendo fattori genetici e cambiamenti nei recettori che alterano la suscettibilità dell'organismo a questa esposizione.

Generalmente le risposte dei biomarker sono considerate essere intermedie tra le fonti di inquinamento e effetti a più alto livello (Suter, 1990). Quando queste risposte compensatorie sono attivate, il potenziale di sopravvivenza dell'organismo può aver già iniziato a calare perché le abilità dell'organismo di organizzare risposte compensatorie alle nuove sfide dell'ambiente così modificato possono essere state compromesse (Deplege e Fossi, 1994). La ragione migliore per usare i biomarker è che possono fornire informazioni sugli effetti biologici degli inquinanti piuttosto che una mera quantificazione dei loro livelli nell'ambiente. I biomarker possono fornire un'idea del potenziale meccanismo dell'effetto dei contaminanti.

Per valutare oggettivamente forze e debolezze dei biomarker, sono stati proposti sei criteri (Stegeman et al., 1992):

- Il saggio che quantifica i biomarker deve essere affidabile, relativamente economico e facile da svolgere;
- La risposta del biomarker deve essere sensibile all'esposizione con l'inquinante e/o servire come un parametro per l'identificazione di segnali precoci;
- La linea di base dei biomarker deve essere ben definita di modo da poter distinguere tra variabilità naturale (rumore) e stress indotto dal contaminante (segnale);

- L'impatto di fattori che possono confondere il segnale dei biomarker deve essere ben definiti;
- Il meccanismo di base della relazione tra risposta del biomarker e esposizione all'agente inquinante (dose e tempo) deve essere stabilito;
- La significatività tossicologica del biomarker, come la relazione tra risposta del biomarker e l'impatto (a lungo termine) sull'organismo, deve essere stabilita.

In aggiunta a questi criteri si ritiene che i biomarkers debbano essere preferenzialmente non invasivi o non distruttivi, per permettere o facilitare il monitoraggio ambientale degli effetti degli inquinanti su specie o habitat protette/i o a rischio (Fossi e Marsili, 1997).

I biomarker utilizzati nel corso dello studio descritto in questa tesi sono già stati utilizzati nello svolgimento di studi precedenti e, in particolare, sono già stati utilizzati proprio negli stessi laboratori EPB di Scienze Ambientali a Ravenna, applicati ad altri studi che coinvolgevano l'utilizzo, come bioindicatore, sia di *Eisenia andrei* che di altre specie.

I biomarker analizzati nell'esperimento sono:

- stabilità delle membrane lisosomiali;
- accumulo di lipofuscine;
- accumulo di lipidi neutri;
- attività dell'enzima catalasi;
- attività dell'enzima glutatione S-transferasi (GST);
- attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE);
- contenuto della malondialdeide (MDA)

1.7.1. Stabilità membrane lisosomiali

I lisosomi sono organuli interni alla cellula che, in parte, si originano come vescicole che si distaccano dall'apparato del Golgi; essi contengono enzimi digestivi, e sono sede di idrolizzazione di macromolecole in monomeri. Questi organuli misurano mediamente 1µm di diametro, sono circondati da una membrana singola, e possiedono un contenuto scarsamente strutturato o totalmente amorfo, che assume intense colorazioni specifiche. A seconda delle necessità, una cellula può

contenere anche dozzine di lisosomi. I lisosomi inglobano entro se stessi il materiale proveniente dall'esterno della cellula (nutrienti o altre sostanze assunte): la fagocitosi ingloba la sostanza extracellulare in un invaginazione della membrana plasmatica, che poi si distacca dal resto della membrana verso l'interno, formando una vescicola che viaggia dentro la cellula (detta fagosoma). La vescicola va poi a fondersi con un lisosoma primario (che si è formato distaccandosi dal Golgi), formando un lisosoma secondario. L' inserimento della sostanza nel lisosoma precede la fase di idrolisi delle sostanze che vi sono state portate dentro, che avviene meglio in condizioni un po' più acide di quelle del citoplasma, cioè a pH 5 invece che 7.

La stabilità della membrana lisosomiale risulta un indice estremamente sensibile dello stato funzionale delle cellule dell'organismo, strettamente correlato all'insorgenza di situazioni patologiche provocate da metalli pesanti e inquinanti organici. Tale indice, pertanto, è in grado di segnalare l'esistenza di una generica condizione di stress ascrivibile all'insieme dei contaminanti chimici accumulati nei tessuti animali (Anzalone L. et al., 2009).

Quando il contenuto di metalli pesanti o inquinanti organici eccede la capacità del lisosoma, vi è un danno e una fuoriuscita, con rilascio di enzimi idrolitici nel citoplasma, che portano a un grave danno cellulare (Marchi B, Burlando B, Moore M.N., Viarengo A., 2003). Questi processi forniscono la base d'utilizzo della stabilità delle membrane lisosomiali come un biomarker generale di stress ambientale (Moore et al., 1984; Viarengo et al., 2000).

1.7.2. Accumulo lipofuscine

Le lipofuscine sono un accumulo granulare di molecole polimeriche non degradabili dalle idrolasi lisosomiali né eliminabili per esocitosi. Tali granuli assumono solitamente una colorazione marrone e sono prevalentemente composti di lipidi. Esse si originano con l'ossidazione di componenti cellulari all'esterno o all'interno dello stesso lisosoma. Tali ossidazioni modificano le molecole in modo da renderle, appunto, non più degradabili. Le lipofuscine sono ritrovate in ogni eucariote, e si accumulano sempre all'invecchiare dell'organismo (da cui il soprannome "pigmento

dell'invecchiamento") e, solitamente, quando l'integrità cellulare viene insidiata (Gaugler., 1997).

La presenza di questi composti organometallici accelera ulteriori eventi ossidativi nelle cellule, fino al punto in cui l'accumulo dei granuli interferisce con le strutture e le attività cellulari.

L'accumulo delle lipofuscine in prossimità del tessuto cloragogeno dei vermi è sintomo di stress ossidativo, generato da H_2O_2 che, essendo una specie reattiva dell'ossigeno, genera il radicale OH, motivo di perossidazione delle molecole fagocitate. I perossidi, instabili, vanno incontro a una catena di reazioni che danno come risultato ammassi con ponti peptido-aldeidici che rendono le lipofuscine non degradabili (Jolly et al., 1995).

1.7.3. Accumulo lipidi neutri

I lipidi neutri insaturi, che comprendono steridi, ceridi e gliceridi formano goccioline localizzate in lisosomi secondari e nel citoplasma. Consistono principalmente in trigliceridi di origine alimentare o sintetizzati de novo, utilizzando l'acetil-CoA a partire dal catabolismo del glicogeno. Essi rappresentano un prodotto d'immagazzinamento utilizzato principalmente per la gametogenesi e secondariamente come fonte energetica quando le riserve di glicogeno sono carenti. Un loro aumento a livello tissutale è spesso associato ad un danno a livello lisosomiale (Guerlet et al., 2005).

L'effetto di inquinanti si manifesta negli organismi con l'aumento di lipidi neutri a livello lisosomiale, che nei vermi utilizzati come bioindicatori si concentra a livello del celoma. Per cui, l'aumento di lipidi neutri è collegato ad un aumento dell'attività metabolica, cioè ad un'alterazione delle condizioni redox lisosomiali.

1.7.4. Attività dell'enzima catalasi

Le catalasi (Figura 2) sono enzimi formati da una proteina e da un gruppo prostetico costituito da ferro porfirina. Sono molto diffuse nelle cellule dei viventi, dove la loro principale funzione è quella di eliminare il perossido di idrogeno (attività catalasica); possono però catalizzare anche l'ossidazione di prodotti metabolici, in ciò, esercitando un'attività simile a quella delle perossidasi (attività perossidasi).

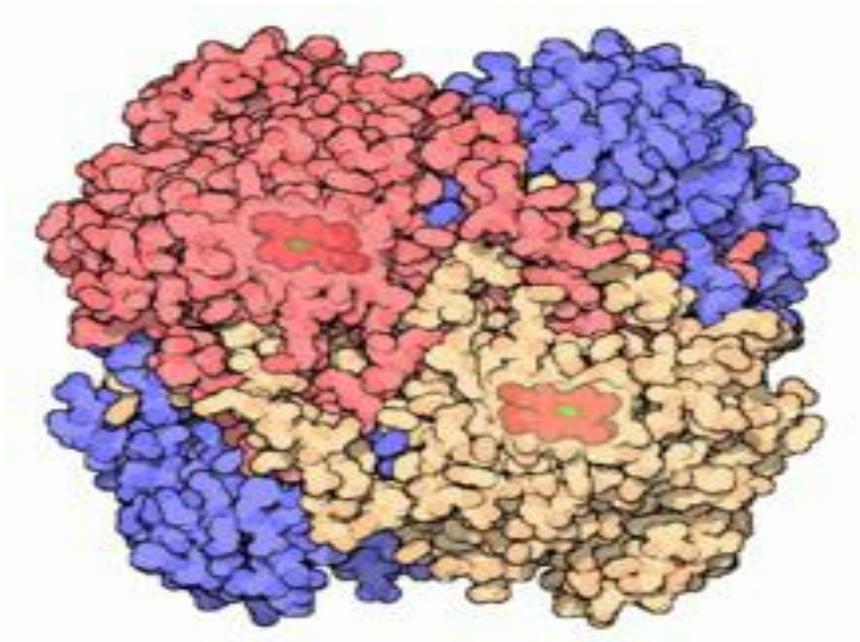


Fig. 2: raffigurazione dell'enzima catalasi.

La catalasi ha uno dei più alti numeri di turnover di tutti gli enzimi; una molecola di catalasi può convertire in un secondo milioni di molecole di perossido d'idrogeno in acqua e ossigeno (Goodsell DS (2004). Questo enzima è un tetramero di quattro catene polipeptidi che, ciascuna composta da oltre cinquecento amminoacidi (Boon EM, Downs A, Marcey D, 2007). Contiene quattro gruppi eme (ferrosi) che permettono all'enzima di reagire con il perossido d'idrogeno. Il valore di pH con cui la catalasi umana lavora meglio è circa 7 (Maehly & Chance, 1954). Per le altre catalasi l'optimum è collocato in un intervallo di pH compreso tra 4 e 11 (BRENDA, 2009), dipendendo dalla specie. Anche la temperatura ottimale varia da specie a specie (Toner et al., 2007).

La metabolizzazione degli inquinanti richiede l'esecuzione da parte dell'organismo di reazioni che coinvolgono specie reattive dell'ossigeno come intermedi, tra cui spicca H_2O_2 . L'organismo si detossifica attraverso la catalasi, che, come descritto in precedenza, trasforma specie reattive all'ossigeno (ROS) in molecole più semplici e meno pericolose. Attraverso la valutazione dell'attività dell'enzima, espresso in nanomoli/minuto/mg proteine, si può valutare come lo stress ossidativo (associato alla formazione di ROS). Per questo, una scarsa attività della catalasi indica un'elevata quantità di ROS presenti e quindi di stress ossidativo.

1.7.5 Attività dell'enzima glutathione S-transferasi (GST)

L'enzimi della famiglia del glutathione S-transferasi (figura 3), abbreviato in GST, sono composti di molte proteine citosoliche mitocondriali e microsomiali. Le GST sono presenti in eucarioti e procarioti, dove catalizzano una varietà di reazioni ed accettano substrati endogeni e xenobiotici (Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005; Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001; Allocati N, Federici L, Masulli M, Di Ilio C, 2009). Le GST possono catalizzare la coniugazione di glutathione ridotto (GSH)(figura 4), attraverso un gruppo solfidrico, a centri elettrofili di una ampia varietà di molecole idrofobiche, che diventano così meno reattive, più solubili in acqua e meglio eliminabili (Douglas KT, 1987; Jakoby 1978). In altre parole, la sua azione fisiologica consiste nella coniugazione di diverse sostanze al glutathione ridotto per la loro eliminazione dall'organismo (Cherchiara T., 2007). L'attività della GST causa una riduzione della concentrazione di GSH e, quindi, dello stato antiossidante della cellula. Dal momento che questa proteina è inducibile da un gran numero di composti chimici, è stato suggerito che il suo livello negli organismi sentinella potrebbe essere utilizzato come indice di esposizione agli inquinanti (Fitzpatrick & Sheehan, 1993; Saint-Denis et al., 1998).

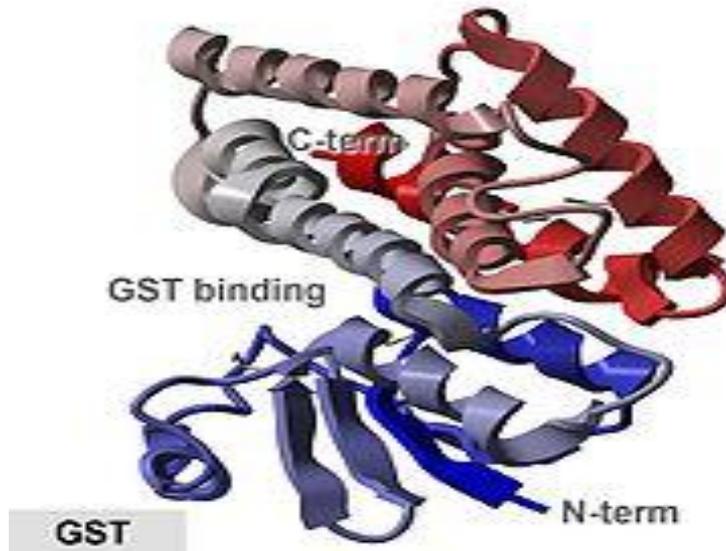


Fig. 3: raffigurazione dell'enzima GST

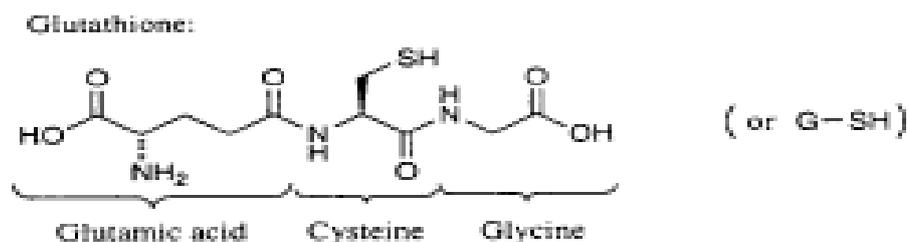
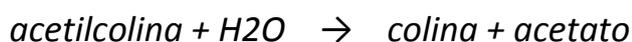


Fig.4: formula chimica del glutathione ridotto

1.7.6 Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

L'enzima acetilcolinesterasi, abbreviato come AChE, è un enzima che degrada, attraverso attività idrolitica, l'acetilcolina, producendo colina e un gruppo acetato, secondo la reazione:



L'AChE ha una elevata attività catalitica, ogni molecola di enzima può degradare fino a venticinquemila molecole di acetilcolina al secondo. La colina prodotta dall'azione dell'acetilcolinesterasi è riciclata, trasportata ove viene utilizzata per sintetizzare nuove molecole di acetilcolina (Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick,

William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, and Leonard E. White, 2008).

Tra i vari biomarker utilizzati in campo ambientale, una posizione di rilievo è occupata dalla misura dell'inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi enzima che entra nella degradazione dell'acetilcolina. E' noto che i carbammati e gli organo-fosforati, utilizzati su larga scala, hanno un'azione inibitoria nei confronti dell'acetilcolinesterasi (Ricciardi F., 2003). La sua inibizione determina dunque il mal funzionamento dei processi di origine nervosa in molte forme di vita. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che si forma, all'interno delle sinapsi. È situata in vescicole di membrana all'interno della terminazione presinaptica della giunzione neuromuscolare; la sua fuoriuscita è determinata dalla nascita di un potenziale di azione, a monte della terminazione presinaptica, che causa la depolarizzazione della membrana e l'apertura di canali voltaggio/dipendenti per il calcio e il sodio. L'inibizione dell'enzima provoca effetti nocivi per la salute dell'organismo che ne è vittima, ostacolando la degradazione dell'acetilcolina.

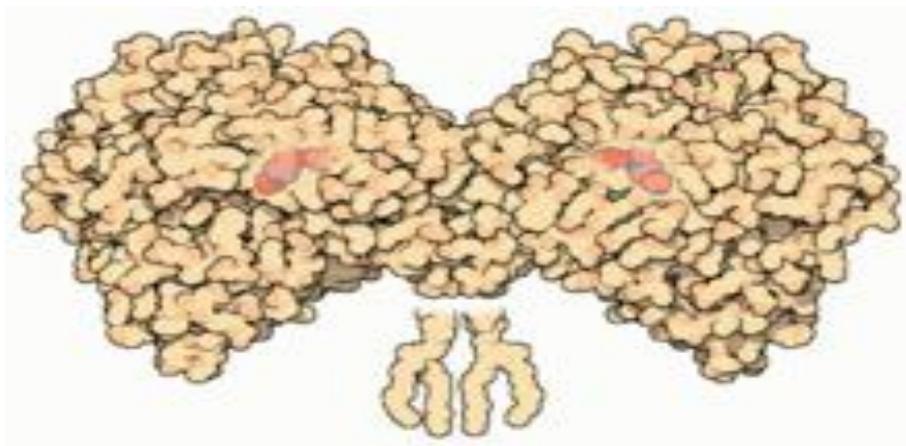


Fig.5: raffigurazione della AChE

1.7.7. Concentrazione della Malondialdeide

La Malondialdeide (MDA), con formula chimica $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, è il principale prodotto della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi; si può inoltre originare dall'attacco dei radicali liberi al deossiribosio e all'acido sialico e da processi enzimatici coinvolti nella sintesi delle prostaglandine.

La MDA si trova nel plasma umano a concentrazioni dell'ordine di $1 \mu\text{M}$ e nelle urine in concentrazioni di $0 - 3 \mu\text{M}$ ($0 - 0.2 \text{ ppm}$).

Questo composto è un aldeide reattiva, causa di citotossicità nelle cellule e in grado di reagire con la deossadenosina e deossiguanina nel DNA, formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi.

1.8. I lombrichi: organismi utili a valutare la salute dell'ambiente

I lombrichi possono essere utilizzati come efficaci bioindicatori in studi di valutazione della qualità del suolo, a sostegno delle metodologie e degli approcci standard di indagine. La loro importanza deriva dal fatto che forniscono una valutazione rappresentativa, rapida ed economica della reale disponibilità delle sostanze chimiche e dei loro effetti biologici per gli organismi che vivono nel suolo.

Essi vivono nel terreno, scavando gallerie sia in senso orizzontale che verticale, si cibano di terreno che ingurgitano in grande quantità, assimilando tutto ciò che vi è in esso di organico e di utilizzabile. L'azione esercitata dai lombrichi sul terreno è sia meccanica sia chimica, infatti con il loro movimento all'interno del terreno esplicano un'azione di frantumazione delle particelle, drenano il terreno facilitando così gli scambi gassosi e rimescolano in senso verticale il terreno stesso; dal punto di vista chimico la loro importanza nel terreno è notevole, infatti è stato dimostrato che la terra che è passata attraverso il loro tubo digerente è molto più ricca di prima di sostanze necessarie allo sviluppo delle piante.

Sono appunto i lombrichi che producono la maggior quantità di humus che ricopre la superficie terrestre, essi in genere ringiovaniscono il suolo aumentandone la

porosità, l'aerazione, la struttura e la capacità di infiltrazione dell'acqua. In particolare la buona aerazione e la giusta umidità del suolo sono per i lombrichi fattori di sopravvivenza in quanto respirano con l'intera superficie del corpo e, se questa si dissecca, il processo respiratorio viene a cessare (Sommaggio e Paoletti,1996).

L'importanza di questi organismi terricoli è indubbia, se si considera il miglioramento da essi apportato alla struttura del suolo e all'incorporazione della materia organica.

Un'altra caratteristica peculiare di questi organismi è la loro sensibilità ai mutamenti e agli squilibri dell'ambiente edafico, ciò li rende oggetto di numerosi studi, perché considerati bioindicatori di salute dell'ecosistema suolo (Prygiel et al., 1999).

1.8.1. Caratteristiche dei lombrichi

Il termine "lombrico", corrispondente all'inglese "earthworm", è utilizzato per indicare gli anellidi terrestri di taglia maggiore, appartenenti, a livello mondiale, a diverse famiglie della sottoclasse Oligochaeta. Le specie europee appartengono essenzialmente alla famiglia Lumbricidae (Menichini., 2008).

1.8.1.1. Phylum Annelida

Il phylum Annelida comprende un vasto numero di invertebrati metamerici dal tipico aspetto vermiforme; sono organismi marini, d'acqua dolce e terrestri. Se ne conoscono circa 17.000 specie suddivise nelle due classi Polychaeta e Clitellata.

Gli anellidi hanno il corpo diviso in segmenti (metameri) che hanno una struttura interna simile e sono separati, internamente, da pareti divisorie. Possiedono un intestino cilindrico che percorre quasi tutto il corpo, sospeso in un celoma riempito di liquido che ha anche funzione di scheletro idrostatico. Hanno un sistema nervoso centralizzato e cellule sensoriali tattili, recettori del gusto, cellule sensibili alla luce (alcuni possiedono occhi sviluppati) e all'umidità.

Il sistema circolatorio è costituito da vasi longitudinali, uno dorsale e altri ventrali che corrono per tutta la lunghezza del corpo. Da questi vasi partono piccole diramazioni che forniscono il sangue a tutti i tessuti del corpo. Ventralmente si trovano cuori che spingono il sangue nei vasi ventrali mentre il vaso dorsale ha una propria muscolatura.

L'apparato digerente è formato da un lungo tubo che attraversa tutto il corpo. La bocca porta ad una faringe che agisce come una pompa. Posteriormente alla faringe si trovano l'esofago, l'igluvie dove il cibo può essere conservato, il ventriglio dove gli alimenti vengono ridotti in poltiglia e l'intestino (Menichini., 2008).

Troviamo poi anche organi escretori; i nefridi. Ve ne sono un paio per metamero. Il nefridio è formato da un tubulo ripiegato più volte che inizia con un'apertura situata nel celoma e termina con un poro esterno. La funzione di tale struttura è quella di spingere il liquido presente nel celoma nel nefridio, dove poi le sostanze necessarie vengono riassorbite mentre i prodotti di rifiuto vengono eliminati.

Il sistema nervoso infine è rappresentato da un cordone. L'anellide possiede cellule sensoriali che gli permettono di reagire agli stimoli. Ogni segmento è fornito di nervi che ricevono gli impulsi dalle cellule sensoriali e di nervi che provocano la contrazione dei muscoli. Nella parte ventrale sono presenti fibre che percorrono tutto il corpo dell'anellide e sono unite formando un doppio cordone.

Dal punto di vista del numero di specie e della rilevanza ecologica le classi più importanti del phylum sono Polychaeta e Clitellata; quest'ultima comprende la sottoclasse Oligochaeta.

1.8.1.2. Sottoclasse Oligochaeta

La sottoclasse Oligochaeta è la più vasta del phylum Annelida. Il gruppo è rappresentato da organismi di acqua dolce e di terra, ma anche da diverse forme marine interstiziali. Noti rappresentanti di questa sottoclasse sono i comuni lombrichi del suolo.

Presentano un corpo allungato che misura di norma tra i 3 mm e i 10 cm. Nella parete del corpo si impiantano le setole che garantiscono l'ancoraggio al terreno durante la locomozione che avviene per peristalsi.

Sono ermafroditi insufficienti che di norma praticano fecondazione incrociata, le uova sono deposte in bozzoli secreti dal clitello (ispessimento ricco di ghiandole mucipare che permette l'adesione dei due individui, che si accoppiano disponendosi in versi opposti) (Menichini., 2008).

Hanno notevoli capacità rigenerative per cui in alcuni casi si assiste alla riproduzione asessuata.

Per quanto riguarda il celoma, parte della splancopleura è trasformata in tessuto claragogeno, uno strato di cellule giallastre per inclusioni lipidiche, che assolve funzioni simili al fegato nei vertebrati; immagazzina i grassi e sintetizza glicogeno e svolge un ruolo detossificante.

1.8.1.3. Famiglia Lumbricidae

Il corpo si presenta allungato composto da molti anelli ciascuno dei quali è dotato di 4 paia di setole orientate normalmente all'indietro; con i movimenti di allungamento e contrazione del corpo queste setole, piantandosi nel terreno, permettono al verme di fare "presa" e quindi di avanzare, anche sotto terra.

Per retrocedere le setole vengono orientate in avanti ed il meccanismo funziona allo stesso modo. I lombrichi respirano attraverso la pelle, che rimane sempre umida, grazie alla produzione di una sostanza vischiosa. Vivono nel terreno umido, da dove fuoriescono soprattutto di notte o dopo la pioggia, infatti non riescono a vivere in ambienti secchi, per cui, fuori della terra, muoiono. I lombrichi, avanzando, inghiottiscono particelle di terra, assieme a sostanze organiche di ogni genere (semi, parti decomposte di piante, uova, larve, ecc.) che trattengono nel corpo e metabolizzano, mentre la terra, arricchita di succhi gastrici viene emessa dall'orifizio anale sottoforma di grumi vermiformi, visibili sul terreno specialmente dopo le piogge (Menichini., 2008).

Questa attività di ingestione di terra e di sua espulsione in superficie consente una notevole ossigenazione del suolo, impedendone la compattazione, e quindi un arricchimento dell'humus.

La vita media di un lombrico va generalmente dai quattro ai sei anni.

In base all'aspetto e al comportamento i lombrichi si possono poi classificare in endogei (ipogei), epigei e anecici. Gli endogei (ipogei) tendono a nutrirsi di residui vegetali in avanzato stato di decomposizione, e vivono negli strati più profondi del terreno (10-20 cm), gli epigei invece vivono tendenzialmente in superficie (5 cm) e si nutrono di sostanza organica poco decomposta e infine gli anecici si nutrono di sostanza organica poco decomposta e scavano lunghe gallerie verticali nel terreno, per cui si trovano sia in superficie che in profondità.

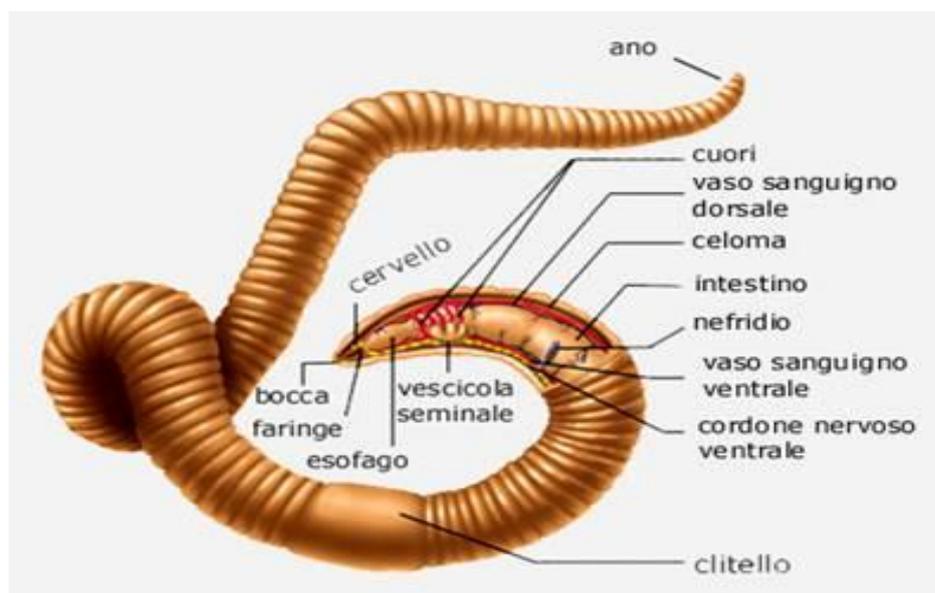


Fig.5: principali strutture morfologiche di un lombrico.

1.8.2. Eisenia andrei

Eisenia andrei Bouchè (1972) comunemente denominato “verme rosso”, costituisce una delle specie epigee di Lumbricidae più rappresentative degli ambienti

pedogenetici limosi ed argillosi, in condizioni non estreme. Essendo epigei prediligono gli strati superiori del terreno con alti contenuti di materia organica. Sono tolleranti ad un ampio intervallo di valori di pH del suolo, tendenzialmente però preferiscono suoli con valori compresi tra 7 e 8 (Edwards & Lofty, 1977).

I lombrichi adulti di questa specie hanno un corpo lungo tra i 35–130 mm e un diametro medio di 3–5 mm e presentano un corpo organizzato in un numero di segmenti compresi tra 80 e 110; il clitello di solito è collocato tra i segmenti 24 e 32. Un'altra struttura caratteristica della specie, situata tra i ventottesimo e trentesimo segmento, sono i tubercula pubertatis; rigonfiamenti ghiandolari posti ai lati del clitello.

Si pensa che abbiano una vita di 5 anni anche se è più comune che il loro ciclo vitale sia compreso tra 1 o 2 anni (Reynolds, 1977). Si accoppiano e depongono le uova sotto terra, raggiungendo la maturità sessuale molto rapidamente, circa 52 giorni, con temperature comprese tra i 20 – 25° C. Questo tempo di maturazione invece è sensibilmente più lungo a temperature più fredde; infatti con temperature di 13° C la maturazione avviene dopo 166 giorni.



Fig.6: Esempio di Eisenia andrei.

Il suo riconoscimento come specie è un fatto piuttosto recente, per lungo tempo, infatti, si riteneva che la specie *Eisenia andrei* fosse una sottospecie, variante del morfologicamente simile *Eisenia fetida* da cui differisce per la sua colorazione. Mentre *Eisenia andrei* possiede una tipica colorazione bruno rossastra, *Eisenia fetida* sono dotati di un caratteristico bandeggio lungo il corpo.

Sono stati effettuati studi e test di tossicità del suolo che evidenziano la diversità tra le due specie (Sheppard, 1988; ISO, 1991, 1998; OECD, 2000).

Una identificazione definitiva può essere fatta basandosi su strutture elettroforetiche di diversi enzimi (McEleroy, Diehl, 2001; McCann, 2004).

Tale verme terricolo è particolarmente tollerante a caratteristiche chimico fisiche quali temperatura, umidità e pH.

Generalmente è uno tra i bioindicatori più utilizzati nei test di laboratorio per valutare lo stato di qualità dei suoli; questo perché possiede risposte che altri organismi non presentano, come ad esempio la capacità di bioaccumulo e di risposta graduale allo stato di stress e la forte sensibilità di alcuni agenti inquinanti (Reynolds 1977).

Queste considerazioni hanno portato poi l'OECD (Organizzazione per la Cooperazione Economica e lo Sviluppo) ad adottare biosaggi sui *Eisenia andrei* in laboratorio, misurando "endpoint" (risposte) sulla riproduzione, sulla mortalità e sull'accrescimento.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi è stato svolto presso il Corso di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente, Università di Bologna con sede a Ravenna.

Il presupposto di questo studio è stato quello di mettere a punto una metodologia volta a valutare gli effetti all'esposizione del farmaco carbamazepina su organismi bioindicatori; i vermi terricoli *Eisenia andrei* (Bouchè., 1972). Si è voluto appositamente valutare e osservare le riposte degli organismi sopra citati, su una matrice del tutto innovativa; il suolo. Difatti dai dati di letteratura troviamo innumerevoli progetti svolti su organismi acquatici mentre per quanto riguarda gli studi che si incentrassero sull'ecosistema suolo la bibliografia è quasi del tutto inesistente. In particolare, lo studio riguarda la possibile contaminazione da residui dei farmaci ad uso umano o veterinario, che si ritrovano nei suoli perché presenti nelle acque di irrigazione o a causa dei fenomeni di esondazione di corsi d'acqua contaminati.

Il seguente studio è durato da Maggio 2012 a Febbraio 2013, periodo in cui sono stati effettuati saggi sub cronici per valutare l'effetto di suoli sperimentalmente contaminati con il farmaco sui parametri del ciclo vitale del lombrico (accrescimento, mortalità e riproduzione) e su una serie di biomarker cellulari.

La batteria di biomarker utilizzata ha previsto la valutazione di:

- **neutral red retention assay (NRRA)** o saggio di ritenzione del rosso neutro per la misura della stabilità delle membrane lisosomiali: biomarker generico sullo stato di salute degli organismi;:
- **accumulo lisosomiale di lipofuscine**: biomarker generico, indice di stress ossidativo;
- **accumulo lisosomiale di lipidi neutri insaturi**: biomarker generico, indica alterazioni del metabolismo;
- **attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)**: biomarker di effetti neurotossici;
- **attività dell'enzima catalasi (CAT)**: biomarker di stress ossidativo;

- **attività degli enzimi glutatione-S-transferasi (GST):** biomarker di stress ossidativo;
- concentrazione di **malondialdeide (MDA):** biomarker di perossidazione lipidica.

3.MATERIALI E METODI

3.1. Principio dell'esperimento

L'attività sperimentale è stata svolta tra Maggio 2012 e Febbraio 2013, presso i laboratori del Centro di Ricerca Interdipartimentale in Scienze Ambientali (CIRSA) dell'Università di Bologna.

In questo saggio di laboratorio è stata valutata l'esposizione di lombrichi adulti della specie *Eisenia andrei* (Bouché 1972) al contaminante Carbamazepina aggiunta a diverse concentrazioni a un suolo naturale.

Il test è stato suddiviso in due fasi: una prima fase della durata di 28 giorni in cui al termine delle 4 settimane si valutano due endpoint del ciclo vitale: la mortalità e l'accrescimento. Una seconda della durata di ulteriori 28 giorni, in cui viene valutata la riproduzione degli organismi, contando i neonati presenti nel suolo e i bozzoli prodotti.

Oltre ai tre endpoint citati è stata applicata una batteria di biomarker di tipo generale e specifico per poter valutare eventuali alterazioni fisiologiche nei lombrichi in risposta a concentrazioni crescenti del contaminante Carbamazepina.

3.2. Provenienza e preparazione del suolo

Il suolo utilizzato per gli allevamenti dei lombrichi e per gli esperimenti è stato prelevato da un'area agricola nel territorio del comune di Argenta (FE), da un appezzamento non coltivato e non trattato con fitofarmaci da almeno dieci anni. Una volta portato in laboratorio è stato esaminato per eliminare radici, sassi, o organismi visibili a occhio nudo, e di seguito sminuzzato manualmente in modo da ottenere frammenti sufficientemente piccoli. È stato quindi completamente

essiccato in stufa a 60 °C, lasciato raffreddare, e nuovamente portato a 60 °C per eliminare eventuali organismi ancora presenti.

Per l'utilizzo negli allevamenti il suolo non è stato ulteriormente trattato. Per l'utilizzo negli esperimenti, il suolo così essiccato è stato poi macinato e setacciato con un mulino a cilindri DARGENT SA con maglia di 2 mm (Fig. 1).



Fig.1: mulino a cilindri DARGENT SA

3.3. Allevamenti

I lombrichi della specie *Eisenia andrei* utilizzati per avviare gli allevamenti di laboratorio che hanno fornito gli individui utilizzati negli esperimenti provengono da un allevamento mantenuto presso l'Università di Alessandria, in particolare da una coorte di individui trasportata presso il CIRSA nel gennaio 2012. Per gli esperimenti sono stati utilizzati individui sviluppati da uova deposte nei laboratori CIRSA a partire da gennaio 2012.

I vermi sono stati mantenuti in vasche di plastica chiuse da coperchio e da un foglio di plastica trasparente forato in modo da permettere il ricambio di aria, all'interno delle quali erano posti 1 kg di suolo essiccato e 1,250 kg di acqua distillata. Il tutto era lasciato a bagno per una notte, dopo di che era aggiunto 1 kg di torba. Le diverse componenti erano poi miscelate manualmente fino ad ottenere un substrato con colore e consistenza omogenea, in cui i lombrichi potessero agevolmente penetrare.

Gli allevamenti sono stati monitorati ogni settimana smuovendo e aerando il substrato, e i lombrichi sono stati alimentati (sempre settimanalmente) con fiocchi d'avena e crusca, inumidendo con acqua distillata il terreno fino al raggiungimento del grado di umidità ottimale.

Sia le vasche di allevamento che le vaschette utilizzate per gli esperimenti sono state mantenute a temperatura costante di 20 ± 1 °C, in condizioni di illuminazione di 400-800 lux e 16 h luce/8 h buio (ISO 11268-2: 2012).

3.4. Test preliminare

La procedura adottata si basa sul metodo standard ISO ISO 11268-2 seconda edizione (ISO, 2012).

Il test preliminare è stato effettuato con lo scopo di valutare a quali concentrazioni di carbamazepina si riscontravano effetti sull'organismo *Eisenia andrei*. Il risultato di questo test è stato in seguito utile per decidere le concentrazioni finali da utilizzare nel test definitivo.

Il suolo essiccato e macinato è stato posto in contenitori di vetro rettangolari tipo frigoverre (20 x 12 x 8 cm in figura 2), in quantità di 600 g per ogni contenitore, annotando il peso del contenitore sia vuoto che pieno.



Fig 2:: vaschetta "frigoverre" usata per il test

Successivamente è stato effettuato lo spiking (giorno -1), ovvero la contaminazione del suolo con soluzioni a concentrazione crescente di Carbamazepina)

Il trattamento di controllo è stato preparato aggiungendo al suolo 200 ml di acqua distillata, mentre per il controllo-solvente si sono aggiunti 200 ml di soluzione stock di metanolo (MetOH), in acqua distillata (40 ml/L).

Le sette vaschette successive (quelle da contaminare) sono state preparate a partire da una soluzione stock di Carbamazepina (100mg/10ml MetOH) portata a volume con acqua distillata in un matraccio da 250 ml. Da questa soluzione stock sono state prelevate aliquote crescenti, rispettivamente 0,15 ml, 0,45 ml, 1,50 ml, 4,50 ml, 15,0 ml, 45,0 ml e 150 ml, ottenendo, nel suolo le concentrazioni 0,01, 0,03, 0,01, 0,3, 1, 3, 10 mg/kg. L'esperimento è stato replicato in due serie (SERIE A e SERIE B).

Dopo l'aggiunta delle soluzioni, i contenitori sono stati pesati e posizionati senza coperchio sotto cappa per fare evaporare il solvente, fino alla mattina seguente.

Il giorno successivo (identificato come giorno 0) i contenitori che erano sotto cappa sono stati pesati nuovamente per verificare la perdita di acqua, e sono stati portati al peso umido del giorno precedente aggiungendo acqua distillata goccia a goccia. Successivamente da ogni vaschetta sono stati prelevati 133 g di suolo destinati ad analisi chimiche (conservati a -80°C). Inoltre ai contenitori è stato aggiunto l'alimento, che consisteva in 3 g di farina d'avena mescolata con 6 g di acqua distillata.

Nella fase successiva si sono aggiunti i vermi alle vaschette, con la seguente procedura: sono stati selezionati 110 vermi totali a partire dalle vasche di allevamento.

Una volta selezionati, i lombrichi sono stati immersi brevemente in acqua per lavarli dal terriccio, e successivamente sono stati suddivisi in gruppi di 10 individui. Ciascun gruppo è stato pesato (peso vivo) e quindi aggiunto a una delle vaschette scelta casualmente.

Alla fine di questa assegnazione, i contenitori per il test sono stati nuovamente pesati e poi chiusi coprendoli con fogli di plastica trasparente forati, per permettere gli scambi gassosi e l'accesso della luce e sono stati posizionati in incubatore termostatico alle condizioni ambientali già descritte per l'allevamento.

Ogni settimana per i successivi 28 giorni i contenitori del test sono stati alimentati con farina d'avena e pesati per verificare la quantità di acqua persa per evaporazione, che veniva reintegrata.

Il ventottesimo le vaschette sono state capovolte per fare fuoriuscire il terreno, mentre i lombrichi sono stati prelevati, lavati, pesati e posizionati uno ad uno in capsule petri, precedentemente preparate con filtro di carta inumidito con 2 ml di acqua distillata.

Due dei 10 lombrichi per ogni vaschetta sono stati subito utilizzati per il neutral red retention assay (NRRA). Gli altri 8 sono stati lasciati nelle petri in incubatore per una notte senza cibo, in modo da far spurgare il canale digerente. Il giorno successivo 2 degli 8 lombrichi per ogni trattamento sono stati utilizzati per preparare i chucks (si veda al paragrafo 3.6.2), e i restanti 6 congelati interi in azoto liquido per le analisi successive.

Dopo il prelievo degli adulti, il terreno, contenente i bozzoli depositi durante i primi 28 giorni di esposizione, è stato rimesso nelle vaschette. , È stato quindi aggiunto l'alimento (4 g di farina avena mescolata con 6 g di acqua distillata) per gli eventuali neonati usciti dai bozzoli nella seconda fase dell'esperimento, che si è protratta per altri 28 giorni fino al 56° giorno.

Ogni settimana a partire dal 28° giorno non si è aggiunto più alimento alle vaschette, ma solo acqua, per ripristinare quella persa per evaporazione.

Il 56° giorno è stata effettuata la setacciatura e la conta dei bozzoli(vedi foto): ogni vaschetta è stata capovolta per trasferire il terreno contenente bozzoli e neonati in vasche di plastica più larghe, nelle quali è stata fatta una prima osservazione per individuare e contare i neonati vivi.

Al termine del conteggio dei neonati la terra è stata posizionata su un setaccio con maglie di 2 mm, sul quale è stata fatta scorrere l'acqua corrente per separare la terra dai bozzoli, infine si è proceduti al loro conteggio, discriminando tra quelli pieni e quelli vuoti (figura 3).



Fig.3: setacciatura e conta dei bozzoli

3.5. Test definitivo

Anche in questo caso, la procedura adottata si basa sul metodo standard ISO ISO 11268-2 seconda edizione (ISO, 2012).

Lo scopo scientifico di questo test era di quello di valutare se esistessero effetti statisticamente significativi all'esposizione del farmaco carbamazepina su organismi sentinella; gli *Eisenia andrei*. Sono state utilizzate quattro concentrazioni crescenti della sostanza; due di queste 0.001 e 0.01 mg/kg facilmente rintracciabili a livello ambientale (in matrici acquose), mentre per gli altri due trattati le concentrazioni sono molto più elevate e difficilmente ritrovabili in ambiente.

Per il test definitivo la preparazione del suolo e delle vaschette è stata analoga al test preliminare. I trattamenti sono stati replicati in 4 serie (A, B, C, D) e nella fase di spiking sono stati aggiunti, oltre al controllo e al controllo-solvente, 2 controlli positivi (Rame 150 mg/kg e clorpirifos 80 mg/kg). La carbamazepina è stata aggiunta al terreno in 4 concentrazioni crescenti (0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 10 mg/kg).

I trattamenti preparati con concentrazioni crescenti di carbamazepina , seguono il seguente schema (tabella 1):

Tabella 1: concentrazioni di Carbamazepina nei vari trattati.

Vaschetta	Concentrazione carbamazepina nel suolo secco (mg/kg)	Concentrazione della soluzione di Carbamazepina (mg/L)	Volume soluzione Stock di CBZ per replica (mL)	Soluzione MetOH per replica (mL)
Controllo	0		0	0
Controllo solvente	0		0	200
CBZ 1	0,001	0,4	1,5	198,5
CBZ 2	0,01	0,4	15	185
CBZ 3	0,1	40	1,5	198,5
CBZ 4	10	40	150	50

3.6. Batteria di biomarker

I biomarker scelti per la batteria impiegata in questa indagine sono riconosciuti dalle linee guida delle organizzazioni internazionali di protezione dell'ambiente.

La batteria di biomarker utilizzata per i tessuti di *Eisenia andrei* prevede la valutazione di:

- **neutral red retention assay (NRRA)** o saggio di ritenzione del rosso neutro: biomarker generico sullo stato di salute degli organismi;
- **accumulo lisosomiale di lipofuscine:** biomarker generico indice di perossidazione lipidica ;
- **accumulo lisosomiale di lipidi neutri insaturi:** biomarker generico, indice di alterazioni del metabolismo;
- **attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE):** biomarker specifico dell'azione neurotossica di insetticidi organofosforici e carbammati;
- **attività dell'enzima catalasi (CAT):** biomarker di stress ossidativo;

- **attività degli enzima glutatione-S-transferasi (GST):** biomarker di stress ossidativo;
- concentrazione della **malondialdeide (MDA)**.

3.6.1. Neutral Red Retention Assay

La stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti è stata valutata attraverso il saggio della ritenzione del rosso neutro (Neutral Red Retention Assay, NRRA). Le cellule sono state estratte dai lombrichi, fatte aderire su un vetrino e incubate con il colorante Neutral Red (colorante cationico debole, lipofilico e che penetra liberamente nelle membrane lisosomiali). Il principio del metodo si basa sul fatto che se la membrana dei lisosomi è danneggiata, questa rilascia il colorante all'interno del citosol. In questo modo il tempo di rilascio del Neutral Red è correlato allo stato di salute del sistema lisosomiale e della cellula stessa in quanto la sua velocità di efflusso è proporzionale al danno.

Questo biomarker non è specifico per determinati tipi di agenti tossici ma, per il fatto che i contaminanti possono determinare effetti additivi o sinergici, la valutazione della stabilità lisosomiale rappresenta l'integrazione degli effetti dei vari stress cui l'organismo è stato esposto.

Al termine dei 28 giorni di esposizione al suolo inquinato, sono stati prelevati due lombrichi per ogni replica) che sono stati utilizzati per questo test-

3.6.1.1. Estrazione dei celomociti

I lombrichi sono stati prelevati dal terreno, lavati in acqua distillata e massaggiati in una soluzione di NaCl 0,01 M in modo da poter espellere la maggior parte del detrito contenuto nell'intestino, poi sono stati asciugati con carta e posti il più velocemente possibile in provette tipo Falcon da 15 ml. Sono stati poi aggiunti 4 ml di medium di estrusione a pH 7,3, a 4°C, in cui sono stati lasciati in incubazione i lombrichi per tre minuti. Il medium di estrusione è una soluzione composta da: Etanolo (EtOH) 5%, Ethylene Diamine Tetracetic Acid (EDTA) 0,02 M (chelante ione calcio), Guauacol

Glycerol Etere (GGE) 0,13 M. Questo mezzo di estrusione irrita i lombrichi, inducendoli ad emettere all'esterno, attraverso i pori presenti nella parete del corpo, il liquido celomatico ricco appunto di celomociti. Al termine dei 3 minuti gli organismi sono stati eliminati dalla Falcon e sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione fisiologica (Hank's Balanced Salt Solution HBSS) per mantenere vive le cellule. Immediatamente il liquido è stato centrifugato a bassa velocità a 4°C, per due minuti separando un pellet, ricco di residuo di terreno, dal surnatante, che è stato poi prelevato e nuovamente centrifugato per 10 minuti a 4°C in modo da ottenere un secondo pellet ricco di celomociti. E' stato poi eliminato quasi tutto il surnatante, conservandone circa 1 ml, in cui è stato risospeso il pellet. Questa sospensione cellulare è stata poi utilizzata per la preparazione dei vetrini.

3.6.1.2. Preparazione e lettura dei vetrini

I vetrini sono stati pretrattati con 3 µl di polilisina (0,1%) per favorire l'adesione delle cellule; questa sostanza è stata spalmata sul vetrino ed è stata lasciata asciugare. Su ognuno dei vetrini poi sono stati fatti aderire 40 µl di sospensione di celomociti, lasciandoli in incubazione 15 minuti a 20°C in una camera umida e al buio, per permettere alle cellule di aderire al vetrino. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 µl di soluzione di colorante rosso neutro e lasciato in incubazione per cinque minuti a 20°C in camera umida al buio.

Le cellule sono state quindi osservate con un microscopio a fluorescenza ad ingrandimento 40x e sono state scattate 20 fotografie per ciascun vetrino, sia al tempo 0 (t0) che dopo 60 minuti (t60). Nell'attesa tra le varie osservazioni i vetrini sono stati lasciati in camera buia ed umida poiché il colorante è fotosensibile.

In seguito le fotografie sono state analizzate mediante il programma di analisi d'immagine Scion Image (versione Beta 4.0.2.) che ha permesso di misurare l'intensità della fluorescenza emessa dalle cellule, proporzionale alla concentrazione del colorante. In questo caso per ogni cellula osservata è stato calcolato il rapporto tra la superficie dell'area fluorescente e quella dell'area totale della cellula. Questa valutazione è stata fatta sia sulle foto scattate al t0 che al t 60.

3.6.2. Accumulo lisosomiale di lipofuscine

La procedura per la determinazione dell'accumulo di lipofuscine si può dividere in due fasi distinte: preparazione dei chucks a partire dal tessuto fresco e lettura dei vetrini contenenti le sezioni di verme dello spessore di 10 micrometri.

3.6.2.1. Preparazione dei chucks

Un chuck è un supporto metallico su cui vengono fatti aderire e posizionati verticalmente alcuni segmenti di lombrico congelati.

La procedura di preparazione è suddivisa in due giornate e consiste nel posizionare prima orizzontalmente e poi verticalmente a distanza di un giorno segmenti di verme di circa 0,5 cm sul supporto in alluminio precedentemente raffreddato a -20° C.

Il primo giorno le sezioni sono state disposte orizzontalmente e quindi il chuck è stato immerso per circa un minuto in esano raffreddato a -70°C con azoto liquido ed infine conservato in freezer a -80°C per almeno 24 ore.

Il giorno successivo i segmenti di verme sono stati disposti verticalmente nel chuck, grazie all'aiuto di una colla che forma su di esso una sorta di superficie piana. Quando lo strato di colla è perfettamente solidificato, il chuck viene ricoperto e posto a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.6.2.2. Preparazione e lettura dei vetrini.

Le sezioni per le analisi istochimiche sono state ottenute mediante l'utilizzo di un criostato, mantenuto a una temperatura di -30° C. Le fettine di 10 µm sono state poi fatte aderire sui vetrini.

Questi sono stati poi trattati con soluzioni specifiche per evidenziare la presenza rispettivamente di lipofuscine o lipidi neutri.

Il contenuto di lipofuscine è stato determinato utilizzando il metodo di reazione di Schmorl. Questa tecnica permette di rilevare la presenza di tali accumuli granulari attraverso una colorazione citosolica.

I vetrini contenenti le sezioni sono stati trasferiti in vaschette di Hellendal e fissati con Ca-formolo a 4° C per 15 minuti, lavati con acqua distillata, colorati con una soluzione (in rapporto 3:1) contenente 45ml di FeCl₃ 1% e 15 ml di Fe(KCN)₆ 1%, mantenuti immersi per 5 minuti a temperatura ambiente e infine sciacquati con CH₃COOH 1% per un 1 minuto.

Successivamente sono stati risciacquati più volte con acqua distillata e lasciati ad asciugare all'aria per qualche ora prima di fissarli con gel di glicerina e ricoprirli con un vetrino copri oggetto.

Sono state poi fotografate le sezioni, nella zona relativa al tessuto cloragogeno, utilizzando una fotocamera (AxioCam, programma MRGrab versione 1.0) montata su microscopio ottico (Axioskop, Zeiss) ad un ingrandimento di 40 x.

Le immagini sono state analizzate con il programma di analisi d'immagine Scion Image per quantificare in termini di densità ottica la quantità di lipofuscine accumulate all'interno dei lisosomi. Sono stati fotografati due vetrini per ogni trattamento, effettuando 5 fotografie per ogni sezione, per un totale quindi di 20 foto per vetrino.

3.6.3. Accumulo lisosomiale di lipidi neutri

La tecnica di valutazione dell'accumulo di lipidi neutri insaturi permette di evidenziare la presenza di trigliceridi all'interno dei lisosomi attraverso una soluzione specifica: l'oil red.

I vetrini contenenti le sezioni sono stati trasferiti in vaschette di Hellendal per istologia e fissati in Ca-formolo per 15 minuti a 4°C, lavati con acqua distillata e immersi in Trietilfosfato 60% per 3 minuti. In seguito sono stati colorati con una soluzione di oil red 0,1% per 15 minuti e mantenuti a temperatura ambiente e al buio. Trascorsi i 15 minuti i vetrini sono stati risciacquati con Trietilfosfato 60% e lasciati immersi per 30 secondi a temperatura ambiente. In seguito è stato eliminato il Trietilfosfato e i vetrini sono stati sciacquati con acqua distillata e lasciati ad asciugare all'aria per qualche ora, prima essere fissati con gel di glicerina e coperti con un vetrino coprioggetto.

Sono state poi fotografate le sezioni, nella zona riguardante la cavità celomatica, utilizzando una fotocamera (AxioCam, programma MRGrab versione 1.0) montata su microscopio ottico (Axioskop, Zeiss) ad un ingrandimento di 40 x. Le immagini sono state analizzate con il programma di analisi d'immagine Scion Image per quantificare in termini di densità ottica la quantità di lipidi neutri accumulati all'interno dei lisosomi. Anche in questo caso sono stati fotografati due vetrini per ogni trattamento, effettuando 5 fotografie per ogni sezione, per un totale quindi di 20 foto per vetrino.

3.6.4. Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi è stata valutata con il metodo di Ellman (1961), che utilizza acetiltiocolina come substrato.

Il test quantifica la velocità di idrolisi del substrato specifico (acetiltiocolina) da parte dell'enzima acetilcolinesterasi in acetato e tiocolina, la quale reagendo con un colorante (DTNB, acido 5,5' ditio-bis(2)51multi pipetta51) sviluppa una reazione colorimetrica con un massimo di assorbanza del prodotto di reazione a 405 nm di lunghezza d'onda.

Questo test è stato effettuato tramite lo stesso lettore di micropiastre utilizzato per il dosaggio delle proteine (Biotek EL 808).

Gli omogenati sono stati preparati in rapporto 1:4 w/v con tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 4°C.

Per la valutazione dell'attività dell'AChE, il tampone fosfato è stato portato a 30° C a bagnomaria. Successivamente è stata preparata la soluzione colorante sciogliendo un quantitativo di colorante DTNB in tampone fosfato a concentrazione 3,17mg/ml.

Gli standard di acetilcolinesterasi sono stati preparati a partire da una soluzione madre di AChEstandard (0,5 mM).

Il substrato (ASCh) per l'analisi è stato preparato ad una concentrazione di 4,34 mg/ml in dd H₂O.

Caricamento della micropiastre:

Una volta preparati gli standard e le opportune diluizioni dei campioni, è stata caricata la micropiastra : il mix per i bianchi e gli standard costituito da 8025 μL tampone + 375 μL DTNB (colorante) è stato posizionato in tutti i pozzetti dedicati al bianco e agli standard (280 μL mix/ pozzetto).

Nei pozzetti del bianco sono stati aggiunti 20 μL di dd H₂O/ pozzetto, per lo standard S1 si sono aggiunti 10 μL dd H₂O/ pozzetto, mentre per gli standard S2, S3, S4, S5 la quantità da aggiungere era di 10 μL standard/ pozzetto.

Per quanto riguarda i campioni, per prima cosa è stato preparato il mix quintuplicato di ogni campione, che viene aggiunto in quantità di 290 μL /pozzetto. Successivamente sono stati aggiunti con una multi pipetta 10 μL /pozzetto di substrato ASCh in tutti i pozzetti eccetto il bianco, ed è stata fatta partire la lettura.

Il software utilizzato nella lettura è GEN5: la reazione è stata seguita per dieci minuti con letture a una lunghezza d'onda di 405 nm a intervalli di un minuto. L'attività dell'enzima è stata espressa in nmol/min/mg di proteina.

3.6.5. Valutazione dell'attività della catalasi e della glutatione S-transferasi (GST)

L'attività di questi due biomarker è stata valutata attraverso metodi spettrofotometrici, servendosi di opportuni reagenti. In entrambi i casi, la preparazione degli omogenati e la determinazione proteica sono state la medesime.

I lombrichi sono stati omogeneizzati a freddo per 1 min tramite un Ultraturrax a 13000 rpm in 5 volumi di buffer potassio-fosfato (KPB) 50 mM pH 7.0 contenente KH₂PO₄ 0.1 M, K₂HPO₄ 0.1 M, Na₂EDTA 0.5 mM e 1 μL di inibitori delle proteasi ogni 100 mg di tessuto. Gli inibitori evitano che proteine ed enzimi, in particolare quelli di nostro interesse, vengano degradati.

Dopo l'omogeneizzazione, i campioni sono stati centrifugati per 15 min a 15000 xg a 4 °C, dopodichè è stato prelevato il surnatante. Di questo, 50 μL sono stati diluiti 1:5 in NaOH 1N per la determinazione proteica, effettuata secondo il protocollo Lowry (1951), usando come standard di calibrazione albumina e letture spettrofotometriche a 660 nm.

Il resto del surnatante è stato utilizzato per i saggi enzimatici.

3.6.5.1. Attività della catalasi

La valutazione dell'attività delle catalasi è stata effettuata mediante il metodo spettrofotometrico di Claiborne (1985), utilizzando come substrato una soluzione di H_2O_2 55mM in KPB 50 mM pH 7.0 a temperatura ambiente.

Facendo avvenire la reazione all'interno di cuvette al quarzo (20 μl di campione in 2.98 ml di

soluzione di H_2O_2) la densità ottica del reagente è stata calcolata a 240 nm, per 2 min alla temperatura di 25 °C utilizzando uno spettrofotometro Multi Sample DU800 Beckman. Se la reazione procede, l'assorbanza dell' H_2O_2 diminuisce col tempo e la pendenza della retta d'interpolazione dei punti di assorbanza è sempre maggiore (valore negativo) man mano che l'attività enzimatica aumenta.

Un'unità di attività (U) è definita come la quantità di enzima in grado di catalizzare la formazione 1 μmol di prodotto al minuto nelle condizioni del saggio specifico. L'attività specifica viene definita come unità di attività per mg di proteine. Il programma restituisce valori di OD min^{-1} , che, noti i parametri spettrofotometrici (cammino ottico e coefficiente di estinzione molare del reagente), le diluizioni ed il contenuto in proteine nel campione (ottenuto dalla determinazione col protocollo Lowry) vengono trasformati in $\text{U} \times \text{mg di proteine}^{-1}$. Per ogni trattamento sono state effettuate 3 repliche.

3.6.5.2. GST

La misura dell'attività delle glutatione S-transferasi è stata effettuata secondo il metodo spettrofotometrico di Habig et al. (1974), utilizzando GSH 1 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) diluito in KPB in modo da avere una soluzione 1 mM. Come già specificato l'enzima coniuga diversi composti con il GSH per renderli più facilmente eliminabili. Al campione contenente l'enzima viene aggiunto un substrato formato da 1-Cl-2,4-dinitrobenzene CDNB (0,8 M) e glutatione ridotto. L'incremento dell'assorbanza registrato a 340 nm per 8 minuti è dovuto alla reazione di coniugazione del CDNB con il glutatione ridotto (GSH) esercitata dall'enzima stesso in maniera proporzionale alla sua attività nei tessuti.

Se la reazione procede, l'assorbanza del composto coniugato aumenta col tempo e la pendenza della retta d'interpolazione dei punti di assorbanza è sempre maggiore (valore positivo) man mano che l'attività enzimatica aumenta.

Ogni campione è stato letto in triplicato.

3.6.6. Malondialdeide

Questo saggio consente di determinare il quantitativo di malondialdeide nei campioni il metodo si basa sulla variazione dell'assorbanza, dopo incubazione a 45°C, della soluzione di 1-metil-2-fenilindolo (NMPI) in acetonitrile quando 2 molecole di NMPI si legano a 1 molecola di MDA generando una carbocianina stabile.

Partendo dagli omogenati di verme diluiti 1:2 con tampone di lisi (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 contenente 100 µL di β-mercaptoetanololo per ogni 100 ml di tampone), sono stati aggiunti alle eppendorf prima un reattivo R1 e poi un secondo reattivo R2 per far partire la reazione.

Il reattivo R1 (10,3 mM NMPI) è stato preparato sciogliendo 0,064 g di NMPI in 30 ml di acetonitrile (conservando il tutto a 4°C). Prima dell'uso sono stati aggiunti 10 ml di metanolo (rapporto MetOH:NMPI=1:3). Per ogni eppendorf sono stati aggiunti 195,2 µL di reattivo R1.

Il reattivo R2 è acido cloridrico concentrato (HCl 37% circa 10.1N). Per ogni eppendorf sono stati aggiunti 100 µL di reattivo R2 sotto cappa chimica.

Lo standard 2 (S2) è stato preparato aggiungendo 16,5 µL di TMOP 10mM (1,1,3,3-tetrametossipropano) in 10 ml di Tris-HCl 20 mM a pH 7,4 (tampone con cui sono stati omogenati i tessuti, senza il β-mercaptoetanololo), poi diluendo 1:100 in H₂O, e infine conservando il tutto in ghiaccio a 4°C.

Le eppendorf (campioni, bianco e standard) sono state incubate per 40 minuti a 45°C in un bagnetto termostatico con lenta agitazione. Al termine dei 40 minuti sono state centrifugate a 13200 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato trasferito direttamente sulla micropiastra.

La micropietra è stata posizionata nel lettore (Bioteck EL 808) che ha misurato l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 nm con una lettura immediata. Per calcolare la quantità di MDA presente nel campione è stato necessario costruita una curva degli standard e da questa è stata estrapolata l'equazione della retta.

Le assorbanze dei campioni sono stati ricavati attraverso un'interpolazione dei dati utilizzando l'equazione della retta standard.

La concentrazione di malondialdeide nei campioni è stata espressa in nanomoli (nmol) per mg di proteine.

3.7. Analisi statistica dei dati

Per verificare l'esistenza di effetti statisticamente significativi della Carbamazepina alle concentrazioni saggiate, i risultati riguardanti i parametri del ciclo vitale (accrescimento, riproduzione e sopravvivenza) e i biomarker sono stati valutati con il test dell'analisi della varianza (ANOVA, (ANalysis Of VAriance)). La verifica di omogeneità della varianza, condizione necessaria per applicare il test, è stata eseguita attraverso il test di Cochran.

Il metodo statistico della ANOVA è basato sulla scomposizione della variabilità totale osservata in due componenti: quella dovuta a differenze tra trattamenti (in questo caso tra diverse concentrazioni di CBZ) e quella residua, dovuta alle differenze entro i trattamenti.

Quando l'ANOVA risultava significativa ($p < 0,05$) è stato usato il test di Dunnett, per individuare quali sono i trattamenti significativamente diversi dal controllo e il test SNK (Student-Newman-Keuls), per raffrontare i trattamenti diversi in assenza di un vero e proprio controllo.

4. RISULTATI

4.1. Test preliminare

Per quanto riguarda il test preliminare, sono stati valutati solo la stabilità delle membrane lisosomiali, attraverso il metodo del rosso neutro, e i parametri del ciclo vitale (sopravvivenza, riproduzione, accrescimento).

In nessun caso sono il test dell'analisi della varianza (ANOVA) ha evidenziato differenze statisticamente significative. Sono però risultate di poco al di sopra della soglia di significatività le differenze per quanto riguarda la percentuale di bozzoli vuoti rispetto al numero totale di bozzoli ($p = 0,508$). Questo endpoint (figura 1) fornisce una misura della vitalità delle uova deposte e della loro capacità di dare origine a neonati in grado di uscire dal bozzolo.

Questo risultato, tenuto anche conto del basso numero di repliche per trattamento, suggeriva la possibilità che la carbamazepina potesse avere un effetto sulla riproduzione alle concentrazioni più elevate saggate in questo esperimento.

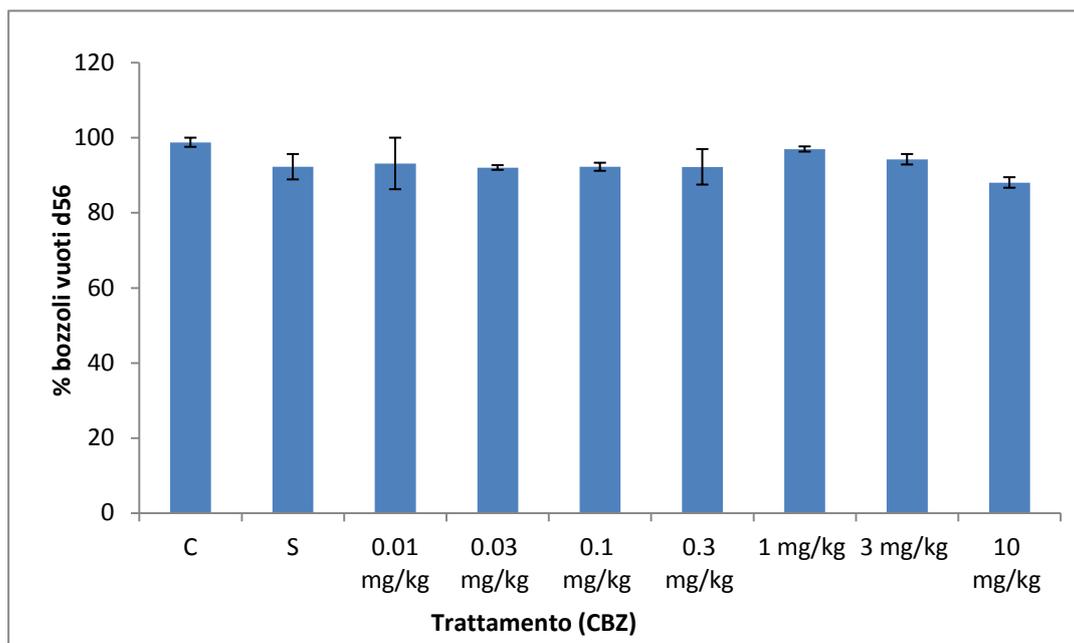


Fig.1- Percentuale di bozzoli vuoti rispetto al numero totale di bozzoli al giorno 56. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori delle due repliche \pm il rispettivo errore standard.

Il test dell'ANOVA (Tabella 4.1.) indica che le differenze tra i trattamenti non sono significative ($p = 0,508$). Dal punto di vista statistico quindi, la percentuale di bozzoli vuoti rispetto al numero totale di bozzoli pieni è equivalente a quella del controllo in tutti i trattamenti.

Tabella 4.1. Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sulla percentuale di bozzoli vuoti rispetto al numero totale di bozzoli di *Eisenia andrei*.

Sorgente di variazione.	SS	df	MS	F	p
Trattamento	153,46	8	19,18	0,977	0,508
Residua	176,79	9	19,64		

4.2. Test definitivo

I risultati sia dei parametri del ciclo vitale che dei biomarker sono espressi in funzione dei trattamenti: controllo (CTR), controllo solvente (SOL), rame 150 mg/kg (CU), chlorpyrifos 80 mg/kg (CP), e carbamazepina a 4 concentrazioni: 0.001, 0.01, 10 e 100 mg/kg (CBZ 1, 2, 3, 4 rispettivamente). Tutte le concentrazioni sono espresse come mg di sostanza su kg di suolo secco.

4.2.1. Stabilità delle membrane lisosomiali

La stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti è stata misurata utilizzando il metodo del colorante rosso neutro, come spiegato più in dettaglio nel capitolo 3 (materiali e metodi). La Figura 4.1. rappresenta il valore al t60 (cioè misurato dopo 60 minuti dalla colorazione) espresso come percentuale del valore al t0 (cioè misurato subito dopo la colorazione) in funzione dei diversi trattamenti.

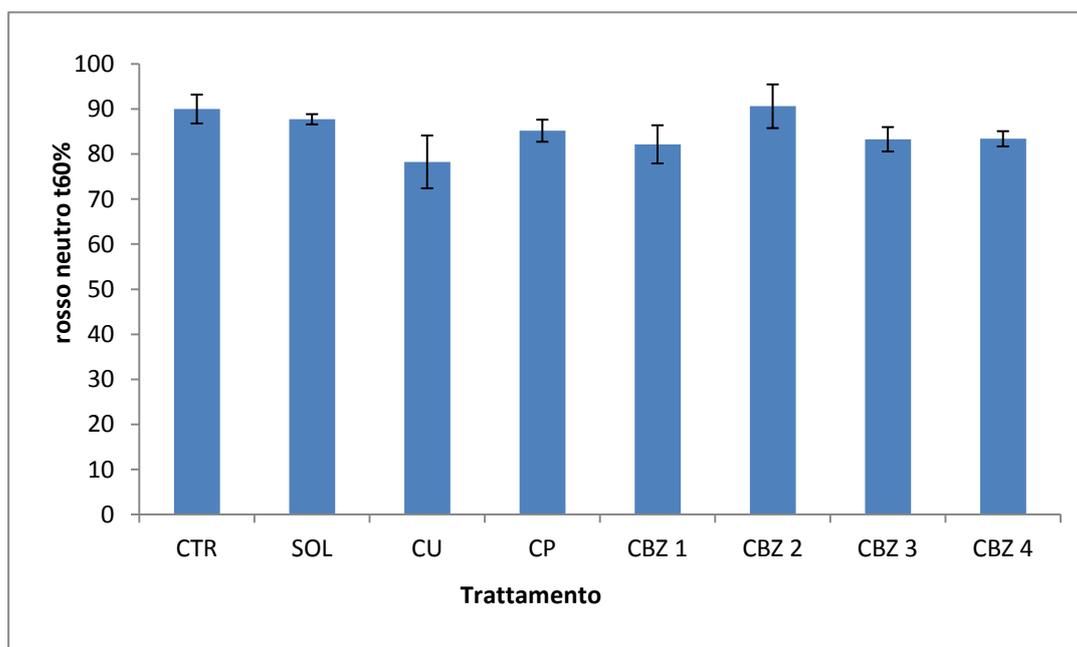


Figura 4.1. - Stabilità delle membrane lisosomiali di cellule celomatiche di esemplari di Eisenia andrei esposti a suoli contaminati sperimentalmente. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori delle quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Il test dell'ANOVA (Tabella 4.1.) indica che le differenze tra i trattamenti non sono significative ($p = 0,268$). Dal punto di vista statistico quindi, la stabilità delle membrane lisosomiali è equivalente a quella del controllo in tutti i trattamenti, in particolare nelle quattro concentrazioni di carbamazepina

Tabella 4.1. Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sulla stabilità delle membrane lisosomiali di *Eisenia andrei*.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Trattamento	492,2	7	70,3	1,356	0,268
Residua	1244,1	24	51,8		

I dati ottenuti dalla valutazione di questo biomarker non mostrano una condizione di sofferenza negli organismi esposti in nessuno dei trattamenti saggiati.

4.2.2. Accumulo di lipofuscine

Il saggio utilizzato per questo biomarker è stato il metodo di reazione di Schmorl. La Figura 4.2. riporta la relazione tra questo endpoint e i diversi trattamenti.

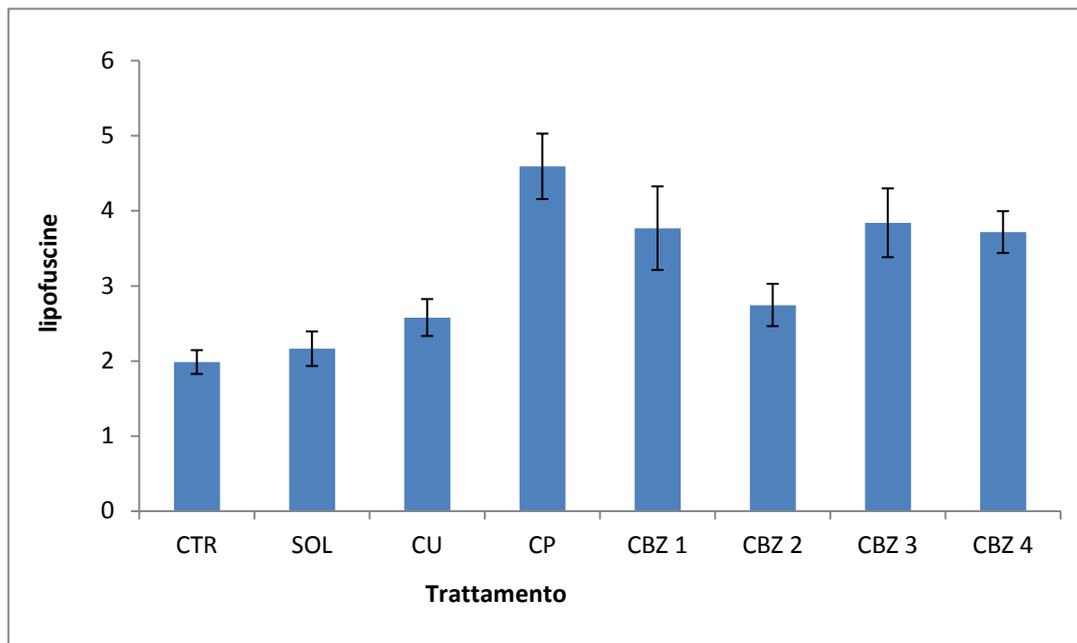


Figura 4.2.- Accumulo lisosomiale di lipofuscine nel tessuto claragogeno di esemplari di Eisenia andrei esposti a suoli contaminati sperimentalmente. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori delle quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

I risultati riguardanti l'accumulo lisosomiale di lipofuscine evidenziano risposte statisticamente significative; questo è confermato dal test dell'ANOVA (Tabella 4.2).

Eseguendo poi i due test a post hoc si evidenzia che per il test Dunnet risulta significativamente diverso dal controllo il trattamento del chlorpyrifos e i trattamenti a concentrazione 0.001, 10 e 100 mg/kg di carbamazepina.

Il risultato ottenuto viene anche poi confermato dal test di Newman-Keuls (tabella 4.3), dove appunto i trattamenti sopra citati risultano statisticamente diversi sia dal controllo che dal controllo solvente.

Tabella 4.2- Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sull'accumulo di lipofuscine nel tessuto cloragogeno di *Eisenia andrei*.

Sorgente di variazione.	SS	df	MS	F	p
Trattamento	24,320	7	3,474	6,906	0,000
Residua	12,074	24	0,503		

Tabella 4.3- Risultati del test di Newman-Keuls per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sull'accumulo di lipofuscine nel tessuto cloragogeno di *Eisenia andrei*. Ciascuno dei valori riportati è il livello di significatività del confronto tra il trattamento lungo la riga e quello lungo la colonna.

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	CBZ 1	CBZ 2	CBZ 3	CBZ 4
CTR		0,726	0,475	0,001	0,018	0,444	0,017	0,016
SOL	0,726		0,416	0,001	0,029	0,487	0,029	0,024
Cu	0,475	0,416		0,006	0,109	0,741	0,120	0,080
CP	0,001	0,001	0,006		0,248	0,009	0,147	0,323
CBZ 1	0,018	0,029	0,109	0,248		0,124	0,888	0,918
CBZ 2	0,444	0,487	0,741	0,009	0,124		0,157	0,065
CBZ 3	0,017	0,029	0,120	0,147	0,888	0,157		0,967
CBZ 4	0,016	0,024	0,080	0,323	0,918	0,065	0,967	

4.2.3. Accumulo di lipidi neutri

In Figura 4.3. è riportato l'accumulo lisosomiale di lipidi neutri in funzione dei diversi trattamenti.

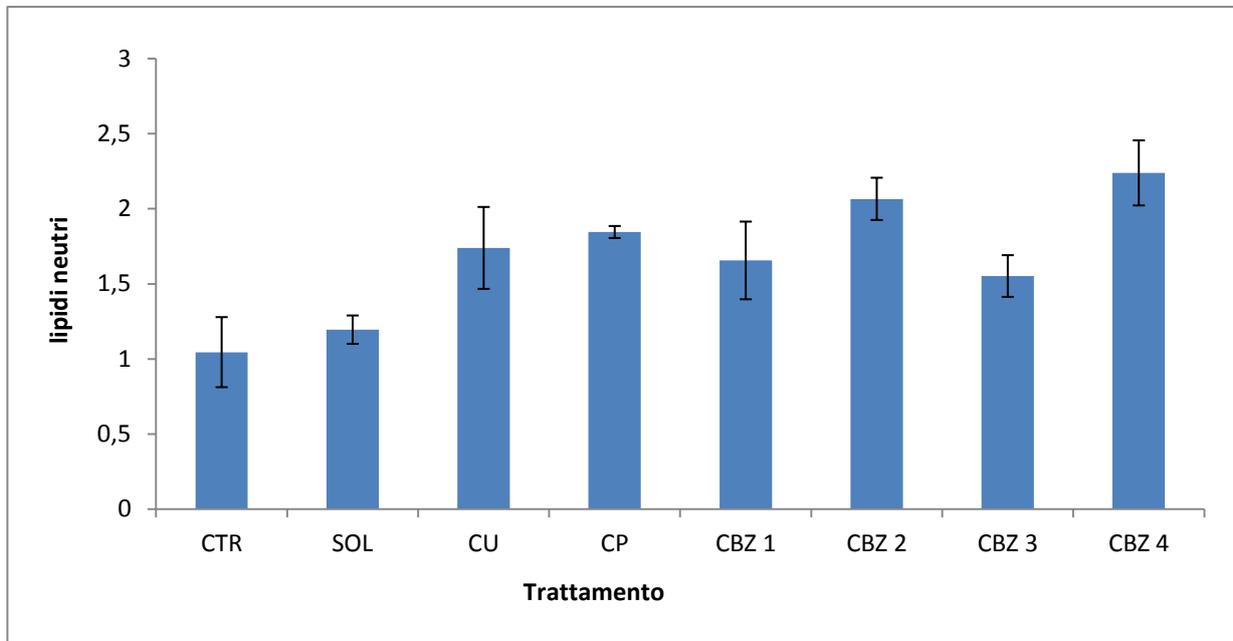


Figura 4.3- contenuto di lipidi neutri all'interno dei lisosomi nel tessuto cloragogeno di verme. I valori riportati rappresentano le media \pm le deviazioni standard delle intensità di pixel 2 ottenute da quattro repliche sperimentali ciascuna analizzata su due sezioni di due vermi, per un totale di quaranta immagine acquisite al microscopio per ogni trattamento.

L'ANOVA (Tabella 4.4) risulta significativa; dal test di Dunnet è emerso che i trattamenti significativamente diversi dal controllo sono il chlorpyrifos e le concentrazioni due e quattro (0,01 e 10 mg/kg) della carbamazepina. Tutto ciò è poi confermato anche dal test di Newman-Keuls (Tabella 4.5).

Tabella 4.4- Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sull'accumulo di lipidi neutri nel tessuto cloragogeno di *Eisenia andrei*.

Sorgente variazione	SS	df	MS	F	p
Trattamento	4,586	7	0,655	4,480	0,003
Residua	3,510	24	0,146		

Tabella 4.5- Risultati del test di Newman-Keuls per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sull'accumulo di lipidi neutri nel tessuto cloragogeno di *Eisenia andrei*. Ciascuno dei valori riportati è il livello di significatività del confronto tra il trattamento lungo la riga e quello lungo la colonna.

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	CBZ 1	CBZ 2	CBZ 3	CBZ 4
CTR		0,584	0,109	0,066	0,136	0,014	0,168	0,004
SOL	0,584		0,211	0,148	0,224	0,038	0,199	0,012
Cu	0,109	0,211		0,699	0,760	0,460	0,770	0,277
CP	0,066	0,148	0,699		0,766	0,423	0,702	0,329
CBZ 1	0,136	0,224	0,760	0,766		0,444	0,705	0,230
CBZ 2	0,014	0,038	0,460	0,423	0,444		0,344	0,528
CBZ 3	0,168	0,199	0,770	0,702	0,705	0,344		0,152
CBZ 4	0,004	0,012	0,277	0,329	0,230	0,528	0,152	

4.2.4. Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi è stata espressa in nanomoli al minuto di enzima per milligrammo di proteina (velocità di produzione del prodotto a partire dal substrato acetiltiocolina). Dal grafico in figura 4.4 si nota come l'unico trattamento che subisce una forte inibizione è il CP, mentre gli altri trattamenti non si discostano molto l'uno dall'altro.

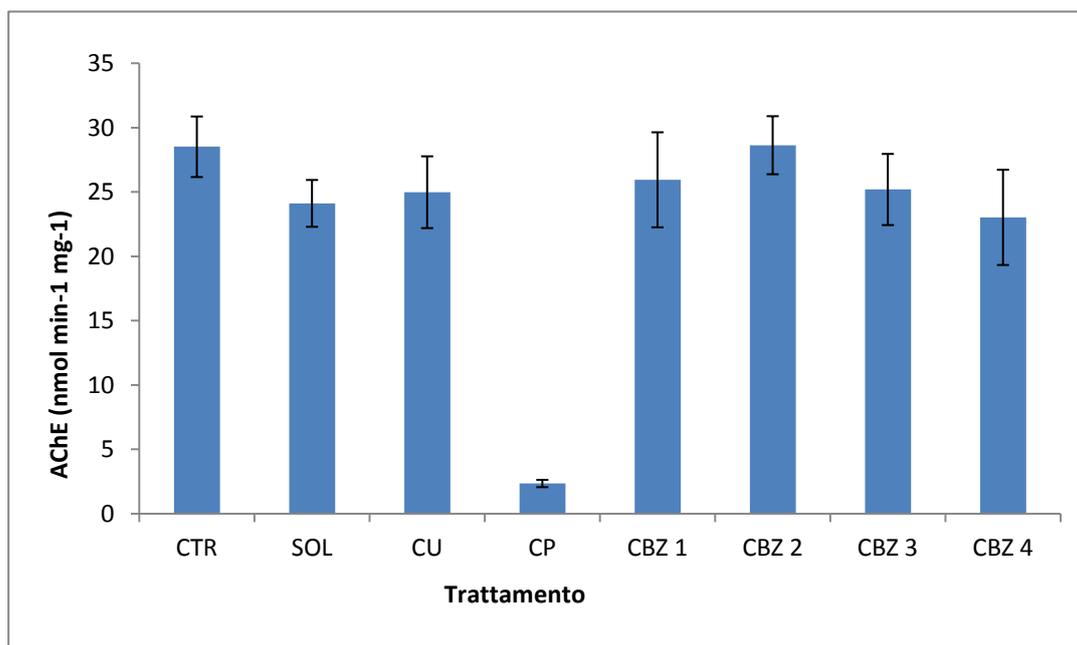


Fig.4.4- Attività dell'enzima acetilcolinesterasi all'interno di Eisenia andrei (tessuto intero) misurata come velocità di reazione in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$. I valori riportati rappresentano la media \pm la deviazione standard.

Il test dell'ANOVA (Tabella 4.6.) indica che le differenze tra trattamenti sono significative ($p = 0,00$).

Tabella 4.6 Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto della concentrazione di dei diversi trattamenti sull'attività dell'AChe di *Eisenia andrei*.

Sorgente variazione.	SS	Df	MS	F	p
trattamento	2029,410	7	289,920	10,208	0,000
residua	681,600	24	28,400		

Dal test di Dunnet e di Newman-Keuls (Tabella 4.7) è emerso che l'unico trattamento significativamente diverso dagli altri è il chlorpyrifos.

Tabella 4.7- Risultati del test di Newman-Keuls per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sull'attività dell'enzima Ache di *Eisenia andrei*. Ciascuno dei valori riportati è il livello di significatività del confronto tra il trattamento lungo la riga e quello lungo la colonna.

	CTR	SOL	CU	CP	CBZ 1	CBZ 2	CBZ 3	CBZ 4
CTR		0,769	0,785	0,000	0,502	0,975	0,657	0,694
SOL	0,769		0,820	0,000	0,961	0,833	0,956	0,775
CU	0,785	0,820		0,000	0,965	0,866	0,956	0,863
CP	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
CBZ 1	0,502	0,961	0,965	0,000		0,758	0,843	0,935
CBZ 2	0,975	0,833	0,866	0,000	0,758		0,798	0,749
CBZ 3	0,657	0,956	0,956	0,000	0,843	0,798		0,939
CBZ 4	0,694	0,775	0,863	0,000	0,935	0,749	0,939	

4.2.5. Attività dell'enzima Catalasi

L'attività della catalasi è stata espressa come velocità di conversione (unità enzimatiche per milligrammo di proteine) da parte dell'enzima del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno.

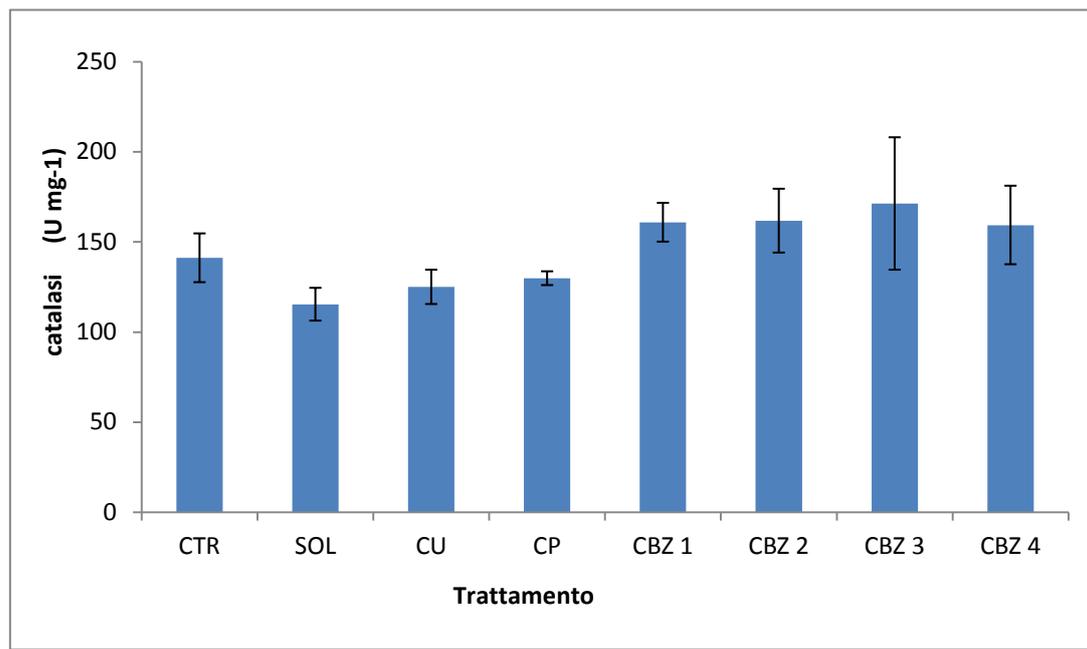


Fig.4.5- I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard dell'attività dell'enzima catalasi, ottenute da quattro repliche sperimentali su omogenati di verme, ed espresse come unità enzimatiche per milligrammo di proteine.

L'ANOVA (Tabella 4.8) è risultata non significativa, quindi nessun trattamento si discosta in modo significativo dagli altri, né dal controllo, perciò non è possibile affermare che alle condizioni testate ci sia un effetto di attivazione di risposte antiossidanti.

Tabella 4.8- Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto della concentrazione dei diversi trattamenti sull'attività dell'enzima catalasi di *Eisenia andrei*.

Sorgente variazione.	SS	df	MS	F	p
Trattamento	11804,400	7	1686,300	1,284	0,300
Residua	31533,000	24	1313,900		

4.2.6. Attività dell'enzima Glutatione-S-Transferasi (GST)

L'attività dell'enzima GST è stata espressa in termini di milli-unità di enzima per milligrammo di proteine, unità di misura che rappresenta la velocità di coniugazione del substrato da parte dell'enzima.

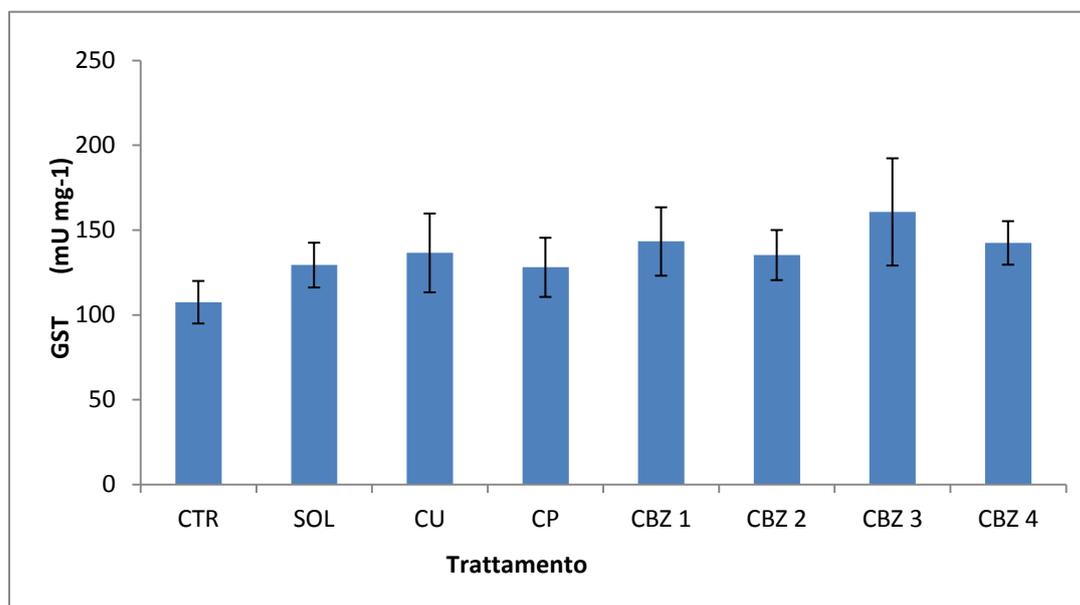


Fig. 4.6- I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard dell'attività dell'enzima glutatione-s-transferasi, ottenute da quattro repliche sperimentali su omogenati di verme, ed espresse come milli-unità enzimatiche per milligrammo di proteine.

Tabella 4.9- Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto della concentrazione dei diversi trattamenti sull'attività dell'enzima GST di *Eisenia andrei*.

Sorgente variazione.	SS	df	MS	F	P
trattamento	6496,700	7	928,100	0,626	0,730
residua	35577,900	24	1482,400		

L'ANOVA indica che le differenze tra trattamenti non sono significative; quindi, in particolare I non ci sono trattamenti che si discostano significativamente dagli dal controllo. Ciò significa che non sono intervenuti meccanismi di detossificazione cellulari.

4.2.7. Malondialdeide (MDA)

La concentrazione di MDA è stata espresso in nanomoli di MDA per milligrammo di proteine. Le repliche a disposizione per questo biomarker erano 2 per trattamento (mentre per gli altri biomarker erano 4).

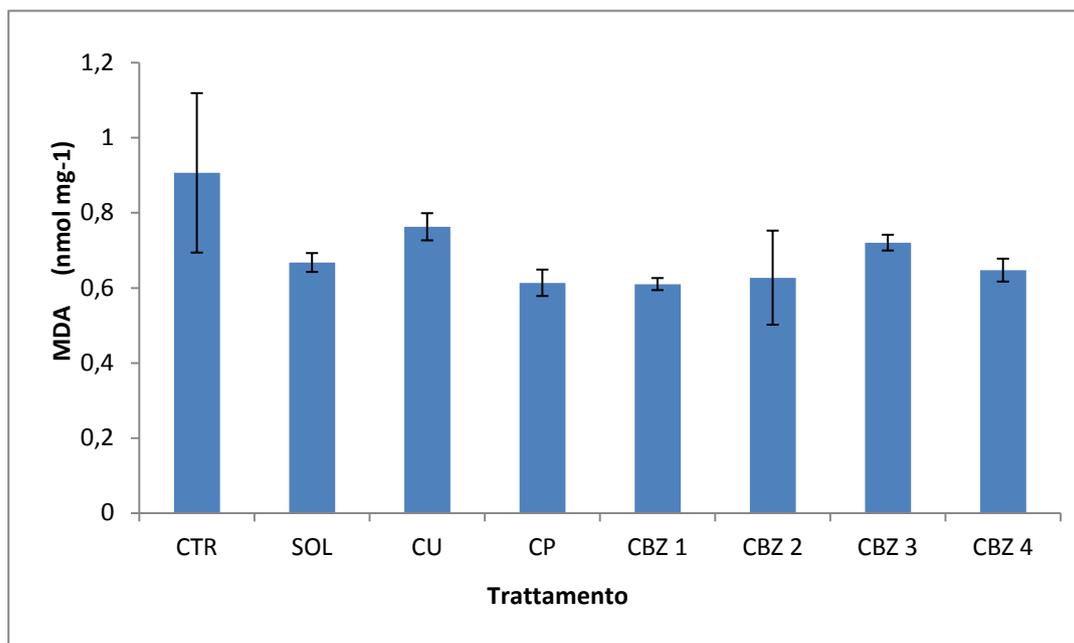


Fig.4.7- I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard del contenuto di malondialdeide, ottenute da due repliche sperimentali su omogenati di verme, ed espresse in nanomoli per milligrammo di proteine.

L'ANOVA, riportata in **Tabella 4.10** non è significativa, perciò non è possibile affermare che ci sia un effetto dovuto alla perossidazione lipidica.

Tabella 4.10- Tavola di ANOVA per la valutazione dell'effetto della concentrazione dei diversi trattamenti sul contenuto di MDA di *Eisenia andrei*.

Sorgente variazione.	SS	df	MS	F	p
trattamento	0,143	7	0,020	1,244	0,380
residua	0,131	8	0,016		

4.2.8. Mortalità

La mortalità in questo test è stata quasi del tutto nulla, poiché dopo 28 giorni di esposizione c'è stato un unico organismo non sopravvissuto, appartenente al trattamento del chlorpyrifos, uno dei controlli positivi inseriti come paragone con la sostanza indagata. Gli organismi appartenenti a questo trattamento hanno subito un cambiamento di comportamento evidente, poiché già dai primi giorni di esposizione presentavano una ridotta mobilità e un colore del corpo scuro. Per quanto riguarda gli altri trattamenti non sono stati riscontrati comportamenti particolari durante la durata del test. Grazie alla elevata sopravvivenza è stato possibile avere organismi a sufficienza per saggiare tutti i biomarker in programma.

4.2.9. Riproduzione

La riproduzione dei lombrichi è stata analizzata contando sia il numero di bozzoli depositi durante i primi 28 giorni di esposizione, sia il numero di lombrichi neonati rinvenuti nel suolo alla fine dei 56 giorni complessivi di esposizione (figura 4.9). La figura 4.8 riporta la media di bozzoli totali (sia vuoti che pieni) per ogni trattamento.

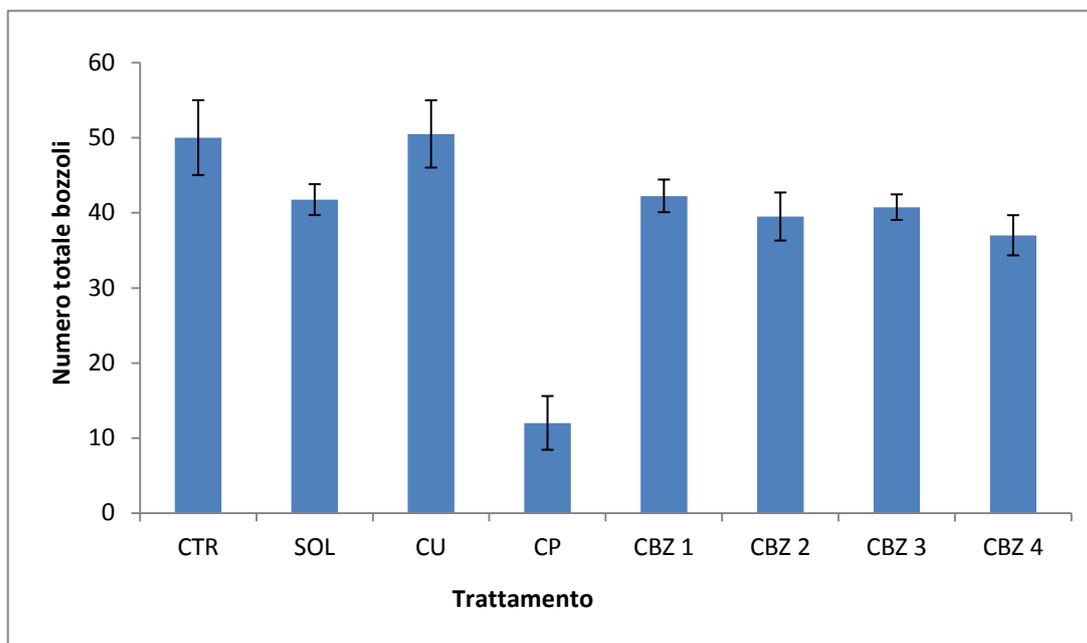


Figura 4.8- bozzoli totali depositi al termine dei 28 giorni di esposizione. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori tra le quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Tabella 4.11- Tavola di ANOVA per la valutazione dei bozzoli totali.

Sorgente variazione.	SS	df	MS	F	p
Trattamento	3926,870	7	560,980	12,884	0,000
Residua	1045,000	24	43,540		

Anche in questo caso l'ANOVA (tabella 4.11) è stata significativa: il Test di Dunnet e di Newman-Keuls (tabella 4.12) hanno evidenziato che il trattamento chlorpyrifos si discosta significativamente dal controllo e dagli altri trattamenti.

Tabella 4.12- Test di Newman-Keuls per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sul parametro "numero totale bozzoli" di *Eisenia andrei*. Ciascuno dei valori riportati è il livello di significatività del confronto tra il trattamento lungo la riga e quello lungo la colonna.

	CTR	SOL	CU	CP	CBZ 1	CBZ 2	CBZ 3	CBZ 4
CTR		0,309	0,711	0,000	0,176	0,304	0,338	0,158
SOL	0,309		0,265	0,000	0,916	0,880	0,832	0,741
Cu	0,711	0,265		0,000	0,202	0,211	0,257	0,097
CP	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
CBZ 1	0,176	0,916	0,202	0,000		0,934	0,945	0,792
CBZ 2	0,304	0,880	0,211	0,000	0,934		0,791	0,597
CBZ 3	0,338	0,832	0,257	0,000	0,945	0,791		0,704
CBZ 4	0,158	0,741	0,097	0,000	0,792	0,597	0,704	

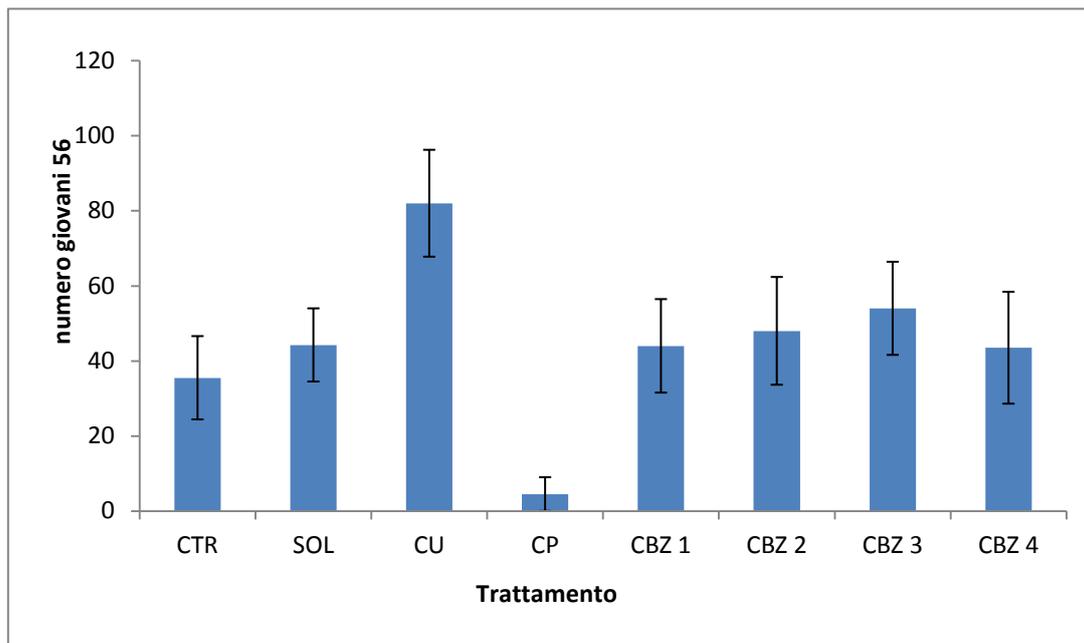


Figura 4.9- numero giovani totale al termine dei 56 giorni di esposizione. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori tra le quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Come si evince dal grafico il numero giovani di *Eisenia andrei* nati al giorno 56 mostra risultati poco attendibili, questa conclusione si giustifica perché all'interno di ogni trattamento la variabilità dei dati ottenuta è molto elevata.

4.2.10. Accrescimento

La risposta all'accrescimento è stata valutata annotando il peso totale per trattamento dei lombrichi prima e dopo l'esposizione di 28 giorni. Le figure 4.10 e 4.11 mostrano rispettivamente il peso medio al giorno 0 e il peso medio al giorno 28.

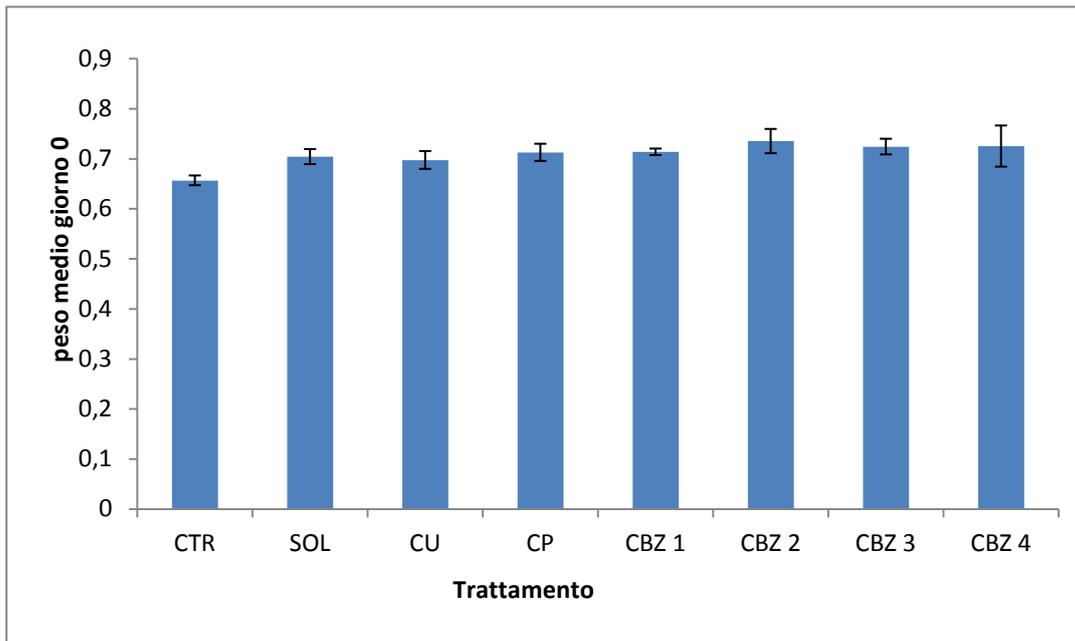


Fig.4.10- Peso medio degli organismi Eisenia andrei al giorno 0 espresse in grammi. Sono riportate le medie dei diversi trattamenti \pm l'errore standard.

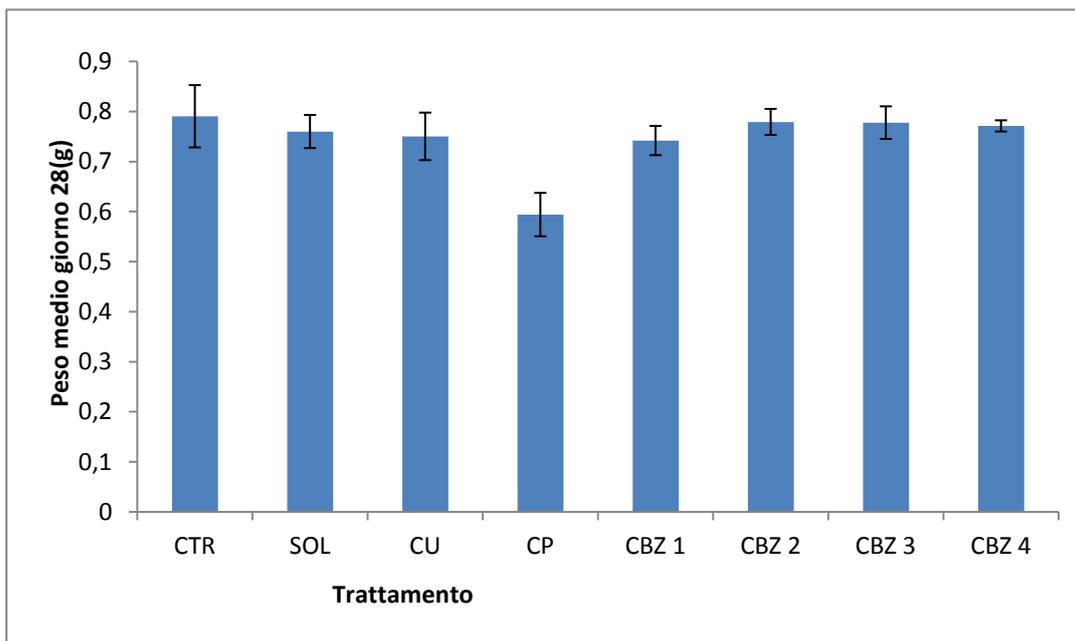


Fig.4.11- Peso medio degli organismi Eisenia andrei al giorno 28 espresse in grammi. Sono riportate le medie dei diversi trattamenti \pm l'errore standard.

Al giorno 0 le differenze tra trattamenti non sono statisticamente significative, indicando che i gruppi di individui assegnati ai diversi trattamenti, prima dell'esposizione, avevano una taglia sufficientemente omogenea.

Si evidenzia che al giorno 28 tutti i trattamenti hanno determinato un aumento del peso totale, tranne il trattamento del chlorpyrifos al quale è evidente una diminuzione. Questo viene confermato anche dalla statistica con il Test dell'ANOVA (tabella 4.13) e dei due successivi test post-hoc di Dunnet e di Newman-Keuls (tabella 4.14).

Tabella 4.13 Test statistico dell'ANOVA sul peso medio degli organismi *Eisenia andrei* effettuato al giorno 28.

	SS	df	MS	F	P
Sorgente variazione.					
Trattamento	0,112	7	0,016	2,712	0,032
Residua	0,142	24	0,006		

Tabella 4.14- Test di Newman-Keuls per la valutazione dell'effetto dei diversi trattamenti sul parametro "peso medio al giorno 28" di *Eisenia andrei*. Ciascuno dei valori riportati è il livello di significatività del confronto tra il trattamento lungo la riga e quello lungo la colonna.

	CTR	SOL	CU	CP	CBZ 1	CBZ 2	CBZ 3	CBZ 4
CTR		0,980	0,975	0,026	0,970	0,838	0,970	0,984
SOL	0,980		0,859	0,026	0,942	0,984	0,943	0,838
CU	0,975	0,859		0,022	0,881	0,983	0,957	0,921
CP	0,026	0,026	0,022		0,012	0,033	0,027	0,025
CBZ 1	0,970	0,942	0,881	0,012		0,982	0,964	0,949
CBZ 2	0,838	0,984	0,983	0,033	0,982		0,978	0,988
CBZ 3	0,970	0,943	0,957	0,027	0,964	0,978		0,906
CBZ 4	0,984	0,838	0,921	0,025	0,949	0,988	0,906	

5.DISCUSSIONE

La batteria di test è stata composta includendo parametri del ciclo vitale (mortalità, accrescimento e riproduzione), meno sensibili ma più ecologicamente rilevanti e parametri biochimici e fisiologici più sensibili e precoci nella risposta ma non necessariamente predittivi sulla salute della comunità.

Dai dati bibliografici è risaputo che la carbamazepina può presentarsi nei terreni, legandosi con estrema facilità alla matrice organica del suolo (Arye et al., 2010) e ciò può implicare quindi una minor biodisponibilità per gli organismi che vi abitano.

Risultato opposto invece si può riscontrare nei vegetali; è stato infatti rinvenuto che la molecola di carbamazepina è facilmente rintracciabile nelle piante di cetriolo (Shenker et al., 2011).

Sulla base dei dati ottenuti nello studio presentato in questa tesi è possibile dire che la carbamazepina alle concentrazioni saggiate e attraverso questa modalità di esposizione non costituisce un elemento di rischio ecologico per gli organismi sentinella *Eisenia andrei*. Infatti dall'analisi statistica effettuata non si evidenziano, per nessuno dei tre parametri del ciclo vitale (mortalità, accrescimento e riproduzione), differenze statisticamente significative rispetto al controllo o al controllo solvente.

Per quanto riguarda i parametri fisiologici presi in considerazione, si notano tuttavia risultati diversi. L'accumulo lisosomiale di lipofuscine e lipidi neutri mostrano una risposta a questo tipo di esposizione. Infatti i lombrichi esposti alle concentrazioni di 0,001, 10 e 100 mg/kg hanno mostrato un aumento dell'accumulo lisosomiale di lipofuscine, risultato statisticamente significativo se messo a confronto con gli organismi esposti al controllo e al controllo con solvente.

Anche per quanto riguarda l'accumulo lisosomiale di lipidi neutri si evidenziano differenze statisticamente significative per i trattamenti a 0,01 e 100 mg/kg rispetto sia al controllo standard sia rispetto al controllo solvente.

Queste alterazioni potrebbero essere spiegate da un effetto di tipo ossidante che ha la carbamazepina (Contardo et al., 2011). Questo è stato ben dimostrato nel caso degli organismi acquatici che sono in grado di bioaccumulare questo farmaco

(Contardo-Jara et al., 2011) e ne subiscono significativi effetti quali: la stimolazione continua di muscoli, ghiandole e sistema nervoso centrale, causando la morte per paralisi respiratoria (Martin-Diaz et al., 2009; Contardo-Jara et al., 2011).

Infatti i due biomarker oltre a rappresentare un segnale di alterazione metabolica rappresentano anche un effetto di perossidazione lipidica. Perciò l'esposizione a crescenti dosi di carbamazepina ha causato un accumulo di lipofuscine e di lipidi neutri nei lisosomi delle cellule del tessuto cloragogeno dei vermi. Ciò significa che pur non causando effetti significativi sugli altri biomarker, l'esposizione alla sostanza ha comunque provocato effetti tossici, nello specifico in seguito all'ingestione, dato che il tessuto cloragogeno, in cui si è osservato l'accumulo, riveste l'interno della cavità intestinale di questi organismi, già noti per l'ingestione di grandi quantitativi di terreno (Penn State College of Agricultural Sciences., 2008).

Sempre dall'analisi statistica emerge chiaramente l'effetto dell'insetticida chlorpyrifos per quanto riguarda sia l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi e sia per quanto riguarda l'endpoint di accrescimento, difatti in entrambi i casi il trattamento risultava statisticamente significativo.

Questi dati confermano la "bontà" dell'approccio sperimentale utilizzato in questo studio; infatti, come già evidenziato da studi condotti in precedenza all'interno del laboratorio, il biomarker che valuta l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi è specifico per la valutazione di effetti di insetticidi e pesticidi organofosfati e carbammati ad azione neurotossica come lo è appunto il chlorpyrifos (Reinecke et al., 2005), mentre per quanto riguarda l'endpoint di accrescimento è risaputo l'effetto che provoca l'insetticida su gli organismi *Eisenia andrei* (Shiping et al., 2011).

6. CONCLUSIONI

I farmaci come la carbamazepina, oggetto di questo studio, sono molecole disegnate e commercializzate per avere effetti specifici negli organismi attraverso determinati meccanismi d'azione.

Tale sostanza è sotto la lente d'ingrandimento sia per le sue caratteristiche chimico-fisiche (vedi la sua alta persistenza in ambiente) sia per della sua alta tossicità per la salute umana (Halling-Sorensen et.al.,93).

Le sue proprietà terapeutiche spesso sono accompagnate da effetti definiti collaterali, e questo si verifica sia in quei pazienti che assumono direttamente il medicinale per lungo tempo o in alte dosi, sia negli organismi non-bersaglio che vengono a contatto con i residui ed i metaboliti del farmaco in ambiente. Questo è stato ben dimostrato nel caso degli organismi acquatici che sono in grado di bioaccumulare la carbamazepina (Contardo-Jara et al., 2011) e ne subiscono significativi effetti (Martin-Diaz et al., 2009; Contardo-Jara et al., 2011).

Le principali fonti di contaminazione della carbamazepina sono rappresentate dagli scarichi domestici, urbani, ospedalieri ed industriali e dagli effluenti di impianti di depurazione, di impianti di acquacoltura e di allevamenti zootecnici intensivi. Anche le pratiche di riutilizzo in agricoltura dei liquami solidi e liquidi, derivanti dagli allevamenti e dei fanghi di depurazione al fine di recuperare composti azotati utili per la fertilizzazione dei suoli, possono contribuire alla diffusione del farmaco nell'ambiente terrestre (Daughton., 1999). Inoltre, l'uso irriguo di acque di corsi d'acqua contenenti residui dei farmaci oppure fenomeni di esondazione degli stessi contribuiscono ampiamente alla distribuzione di questi composti nei suoli. Occorre ricordare che i depuratori sottraggono alle acque di scarico percentuale molto basse (dallo 0 al 9%) di carbamazepina e che questa sostanza ha un tempo di vita in ambiente calcolato di 100 giorni, pertanto è ritenuta pseudopersistente (Fent et al., 2006)

La matrice suolo ha avuto assai poca attenzione per quanto riguarda gli effetti dell'inquinamento sugli organismi in generale, ed in particolare non vi sono studi sui farmaci. Da qui nasce il presupposto per il seguente studio che è stato effettuato

testando quattro concentrazioni crescenti del farmaco carbamazepina in un una matrice terrestre.

Come precedentemente descritto sono state svolte misurazioni di parametri del ciclo vitate (mortalità, accrescimento e riproduzione) e misurazioni di una batteria di biomarker.

Lo studio in esame è stato fatto per poter valutare, sugli organismi sentinella quali gli *Eisenia andrei*, l'esistenza di effetti significativi all'esposizione del farmaco. L'approccio è difatti svolto non solo dal punto di vista ecologico/ambientale ma anche dal punto di vista biologico-fisiologico, valutando quindi le possibili alterazioni molecolari o cellulari.

Si è riscontrato che la carbamazepina non ha effetti sui parametri del ciclo vitale: a determinate concentrazioni e specifiche esposizioni, non ha conseguenze di tipo ecologico sui bioindicatori.

Per quanto riguarda i parametri fisiologici si notano tuttavia dei risultati diversi. L'accumulo lisosomiale di lipofuscine e lipidi neutri indica che i vermi sono vulnerabili all'esposizione alla carbamazepina con riferimento alle concentrazioni saggate,(che tuttavia, come anticipato, non è letale per gli organismi). L'esposizione ha causato un accumulo di lipofuscine e di lipidi neutri nei lisosomi delle cellule del tessuto cloragogeno dei vermi. Ciò significa che pur non causando effetti significativi sugli altri biomarker, l'esposizione alla sostanza si è comunque verificata, nello specifico per via alimentare, dato che il tessuto cloragogeno, dove si è riscontrato l'accumulo, riveste l'interno della cavità intestinale di questi organismi, già noti per l'ingestione di grandi quantitativi di terreno.

Queste alterazioni potrebbero essere spiegate da un effetto di tipo ossidante che ha la sostanza; infatti i due biomarker oltre a rappresentare un segnale di alterazione metabolica rappresentano anche un effetto di perossidazione lipidica.

Queste osservazioni meritano di essere approfondite studiando il bioaccumulo e la degradazione della carbamazepina nei suoli, che potrebbero essere alla base della diversità di risultati rispetto alla tossicità evidenziata negli organismi acquatici. In particolare è possibile che la carbamazepina sia maggiormente trattenuta dalla matrice organica del suolo e quindi risulti meno disponibile per gli organismi (anche se può essere assunta dai vegetali) oppure che sia degradata in maniera sufficientemente rapida. La valutazione del rischio ecotossicologico di una sostanza

si basa anche sul potenziale bioaccumulo che può essere pericoloso per il biota (incluso l'uomo) per trasferimento nella catena trofica. Le ricerche riscontrate sono circoscritte solamente al bioaccumulo della sostanza nelle piante (in specifico piante di cetriolo) (Shenker et al.,2011)

Dal momento che non esistono ancora studi specifici della carbamazepina in organismi del suolo, ci si pone come obiettivo futuro l'analisi del bioaccumulo del carbamazepina nei lombrichi, in modo da avvalorare la scelta di questi organismi come sentinelle ambientali e valutare se i vermi possono essere o meno il tramite della distribuzione della carbamazepina nella catena trofica.

Per concludere si evidenzia che l'elevato e crescente consumo nei Paesi industrializzati sia dei farmaci (tra cui appunto la carbamazepina) destinati all'uomo, che dei prodotti ad uso veterinario negli allevamenti a terra e in acquacoltura non può che comportare l'incremento delle emissioni e quindi della presenza di tali composti in ambiente, tenendo presenti i limiti delle tecnologie in uso nei comuni impianti di depurazione rispetto all'eliminazione di tali composti e loro metaboliti (EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) – CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use)).

Pertanto, a fronte della consapevolezza dei rischi potenziali dovuti alla presenza di farmaci nelle acque e nel suolo, molto resta da fare per ampliare le conoscenze su questa tipologia di contaminazione, in particolare nei campi del monitoraggio e del comportamento ambientale, degli studi ecotossicologici e di procedure e tecnologie idonee a limitare la loro immissione nell'ambiente (Bottoni & Fidente., 2005)

BIBLIOGRAFIA

1. ANPA (Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente), 2000. *Indicatori e indici ecotossicologici e biologici applicati al suolo. Stato dell'arte.*
2. António F. Ambrósio, Patrício Soares-da-Silva, Caetana M. Carvalho, Arsélio P. Carvalho (Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024 Neurochemical Research; February 2002, Volume 27, Issue 1-2, pp 121-130)
3. Anzalone L., Agnetti F., Tavoloni T., Lestingi C., Susini F., Latini M. (APPLICABILITÀ DEL TEST DI STABILITÀ DEI LISOSOMI IN PESCI D'ACQUA DOLCE. E SALATA 2009)
4. ARPA (Agenzia Regionale per le Protezione dell'Ambiente) Emilia-Romagna, 2005. – *Annuario regionale dei dati ambientali. Cap. 8*
5. Bouchè M.B., 1972. *Lombriciens de France. Ecologie et systematique. INRA Pub. 72-2. Institut National Des Recherches Agricoles, Paris.*
6. Burlando B., Bonomo M., Caprì M., Mancinelli G., Pons G., Viarengo A., 2004. *Different effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on mussel (Mytilus galloprovincialis) plasma membrane Ca²⁺-ATPase: Hg²⁺ induction of protein expression. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 139: 201-207.*
7. College of Agricultural Sciences Agricultural Research and Cooperative Extension., 2009 *Earthworm.*
8. *Comunicazione della Commissione, del 16 aprile 2002, al Consiglio, al Parlamento europeo, al Comitato economico e sociale e al Comitato delle regioni: Verso una strategia tematica per la protezione del suolo. COM(2002) 179.*

9. Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C.,2011*Aquat Toxicol.* 2011 Oct;105(3-4):428-37. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.07.017. Epub 2011 Aug 4. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*
- 10.Cunningham V, Perino C, D'Aco VJ, Hartmann A, Bechter R, Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 56: 343-351, 2010
- 11.Dalla Marta Anna,2010. *La degradazione dei suoli Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali, del Suolo e dell'Ambiente Agroforestale Università di Firenze*
- 12.Daughton CG, Ternes TA, 1999. *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes? Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.
- 13.Depledge, 1994. *European Environmental Management: Moving to an Ecosystem Approach*
- 14.Dilsaver, Steven C.; Swann, Swann C.; Chen, Yuan-Who; Shoaib, Arif; Joe, Brooks; Krajewski, Kenneth J.; Gruber, Nelson; Tsai, Yafei *Biological Psychiatry*, Vol 40(9), Nov 1996: *Treatment of bipolar depression with carbamazepine: Results of an open study.*
- 15.Edwards C A and Lofty J R 1977 *The influence of arthropods and earthworms upon root growth of direct drilled cereals. J. Appl. Ecol.* 15, 789–795.
- 16.EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) – CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use). *Guideline on the*

environmental risk assessment of medicinal products for human use. EMEA web-site: www.emea.eu.int. Ultima consultazione: luglio 2005.

17. *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*
18. *Fent K, Weston AA, Caminada D. Aquat Toxicol. 2006 Feb 10;76(2):122-59. Epub 2005 Oct 27. Review. Erratum in: Aquat Toxicol. 2006 Jun 15;78 Ecotoxicology of human pharmaceuticals.*
19. *Fossi, M.C. e Leonzio, C. (1994). Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis Publishers, CRC Press, United States. pp. 345.*
20. *Fossi M.C. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. Environ. Health Perspect. 102, (12):49-54*
21. *Gilboa Arye , Ishai Dror, Brian Berkowitz.,2010 Fate and transport of carbamazepine in soil aquifer treatment (SAT)infiltration basin soils.*
22. *Guerlet E, Ledy K, Giambérini L., 2005. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail Radix peregra (Gastropoda, Pulmonata). Aquat Toxicol. 77(1):19-32.*
23. *Guerrini S. 2006. Impiego di biomarker per valutare la contaminazione dei suoli mediante vermi terricoli. Tesi di Laurea Specialistica, Università di Bologna.*
24. *Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. Chemosphere 1998;36(2):357-93.*

25. Herbert D. and Pinsent J., 1948a. Crystalline bacterial catalase. *Biochem. J.* 43: 193-202.
26. Herbert D. and Pinsent J., 1948b. Crystalline human erythrocyte catalase. *Biochem. J.* 43: 203-205.
27. Iserentant, R. et De Sloover, J., 1976. Le concept de bioindicateur. *Mem. Soc. Roy. Bot. Belg.* 7:5-24.
28. Jakoby W.B., 1978. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins, *Advanced Enzymology.* 46: 383–411.
29. Jolly R.D. et al., 1995. Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology.* 41 Suppl 2: 283-95.
30. Kinney, CA, Furlong, ET, Werner, SL, e Cahill, JD, 2006, Presenza e distribuzione di acque reflue derivate da prodotti farmaceutici nel suolo irrigate con acqua riciclata : *Tossicologia e Chimica Ambientale*, v. 25, n. 2, p. 317-326, doi: 10.1897/05-187R.1.
31. Loos, Giovanni Locoro, Sara Comero, Serafino Contini, David Schwesig, Friedrich Werres, Peter Balsaa, Oliver Gans, Stefan Weiss, Ludek Blaha, Monica Bolchi, Bernd Manfred Gawlik, Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water, *Water Research* 44: 4115-4126, 2010
32. Lowry O.H., Rosenbroughn J., Farra L. and Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
33. Martin-Diaz L, Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

34. McCann J., 2004. *Report on the identification of earthworm test cultures (Eisenia andrei and E. fetida) and potential commercial sources of earthworms.*
35. McCarthy F. and Shugart L. R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination.* Lewis Pub., Chelsea USA.
36. McElroy T.C. and Diehl W.J., 2001. *Heterosis in two closely related species of earthworm (Eisenia fetida and E. andrei).* *Heredity*, 87: 589-608.
37. Minardi S, 2009 *Possibile utilizzo dei biomarker istochimici per la valutazione degli effetti della salinizzazione del suolo sul lombrico Eisenia andrei*
38. Ministero della Salute. *Sintesi ed aggiornamento del rapporto: L'uso de farmaci in Italia. Rapporto Nazionale gennaio settembre 2001.* Roma: Direzione Generale della Valutazione dei Medicinali e della Farmacovigilanza; 2001.
39. Moore M.N., 1988. *Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPHferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics.* *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 46: 81-89.
40. Moore M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, P., 2004. *An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management.* *Mutat. Res.* 552: 247-268.
41. Moshe Shenker, Daniella Harush, Julius Ben-Ari, Benny Chefetz Department of Soil and Water Sciences, Israel., *Uptake of carbamazepine by cucumber plants – A case study related to irrigation with reclaimed wastewater*

42. Nappi P., 2000. *L'utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici per valutare la qualità del suolo: stato dell'arte. Seminario internazionale: Indicatori biologici ed eco tossicologici applicati al suolo e ai siti contaminati. Torino 19 maggio 2000.*
43. OECD (Organization for Economy Co – operation and Development), 1984. *OECD guideline for the testing of chemical. Earthworm, acute toxicity test. # 207. Paris, France.*
44. OECD (Organization for Economy Co – operation and Development), 2000. *OECD guideline for the testing of chemicals. Earthworm reproduction tests (Eisenia fetida\ Eisenia andrei). #222. Paris. France.*
45. Peakall D.B. and Shugart L.R. 1993. *Biomarkers: research and application in the assessment of environment health. NATO ASI, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, H68: 31-48.*
46. Pojana, Andrea Fantinati, Antonio Marcomini, *Occurrence of environmentally relevant pharmaceuticals in Italian drinking water treatment plants, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 91 (6): 537-552, 2011*
47. Prygiel, J., Rosso-Darmet, A., Lafont, M., Lesniak, C., Durbec, A. and Ouddane, B. (1999). *Use of oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediment of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). Hydrobiologia, 410, 25-37.*
48. Reinecke, A.J. *Reinecke Department of Botany and Zoology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa Received 3 May 2005; received in revised form 1 September 2005; accepted 11 October 2005 Available online 1 December 2005 Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms*

49. Reynolds J. W., 1977. *The earthworms (Lumbricidae and Sparganophiliadae) of Ontario. Life Sci. Misc. Publ. Royal Ontario Museum, Toronto, ON.*
50. Sheppard, 1988; ISO, 1991, 1998; OECD, 2000) *Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods*
51. Shiping Zhou^{1,2,*}, Changqun Duan², Wong Hang Gi Michelle², Fazhong Yang¹, Xuehua Wang¹ 2010., *Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm*
52. Sommaggio D., Paoletti M.G., Favretto M.R., 1996 - *I lombrichi e gli agroecosistemi. BioAgricoltura, 43: 37-41*
53. USDA-NRCS (United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service), 2003. *Keys to Soil Taxonomy, 9th edition. Soil Survey Staff. Washington D.C.*
54. Viarengo A., Mancinelli G., Pertica M., Fabbri R. and Orunesu M., 1993. *Effects of heavy metals on the Ca²⁺-ATPase activity present in gills cell plasma-membrane of mussels (Mytilus Galloprovincialis Lam.). Comp. Biochem. Physiol. 106C: 655-660.*
55. Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Burlando, B., Canesi, L., Orunesu, M., 1996. *In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussel gill cell plasma membranes. Comp. Biochem. Physiol. C 113: 421-425.*
56. Viarengo A., Ponzaro E., Dondero F., and Fabbri R., 1997. *A simple spectrophotometric method of MT evaluation i marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar. Environ. Res. 44: 69-84.*

57. Viarengo A., Pons G., Fabbri R., Mozzone S., Evangelisti V. and Caprì F., 1998. Evaluation of the physiological status of *Chamela gallina* using biomarkers. *Biol. Mar. Medit.* 5: 1-10.
58. Viarengo A., Burlando B., Cavalletto M., Marchi B., Ponzano E. and Blasco J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* R1612- R1619.
59. Zhang Y., Geissen S., Gal C., Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, *Chemosphere*, 73: 1151-1161, 2008