



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA ED ALIMENTAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**SAGGIO SU QUATTRO GENERAZIONI PER LA VALUTAZIONE DI
EFFETTI TOSSICI TRANSGENERAZIONALI DELLA FLUMECHINA,
IN DAPHNIA MAGNA**

RELATORE: CHIAR.MO PROF. MARCO DE LIGUORO

LAUREANDA: GIOVANNA PEGORARO

ANNO ACCADEMICO 2021 - 2022

“Il nostro compito è fare il possibile per la salvezza degli anni nei quali viviamo, sradicando il male dai campi che conosciamo, al fine di lasciare a coloro che verranno dopo terra sana e pulita da coltivare.”

J.R.R. Tolkien

Sommario

INTRODUZIONE	4
1 ECOTOSSICOLOGIA	5
1.1 DEFINIZIONE.....	5
1.3 ECOTOSSICOLOGIA ACQUATICA.....	6
2 IMPATTO AMBIENTALE DEL FARMACO VETERINARIO	9
3 TEST DI ECOTOSSICITÀ ACQUATICA E ORGANISMI MODELLO	12
4 CHINOLONI E FLUOROCHINOLONI	17
4.1 MECCANISMO D’AZIONE.....	17
4.2 SPETTRO D’AZIONE E IMPIEGHI TERAPEUTICI.....	18
4.3 FARMACOCINETICA E PROPRIETÀ FISICO – CHIMICHE	19
4.4 SAR	20
4.5 TOSSICITÀ.....	21
5 FLUMECHINA	25
5.1 STRUTTURA.....	25
5.2 UTILIZZI.....	25
5.3 CHEMODINAMICA AMBIENTALE.....	26
5.4 IMPATTO SULL’AMBIENTE ACQUATICO	27
6 DAPHNIA MAGNA STRAUS	30
6.1 MANTENIMENTO IN COLTURA DI <i>Daphnia magna</i>	35
7 SCOPO DELLA TESI	36
PARTE SPERIMENTALE	37
8 MATERIALI E METODI	38
8.1 MATERIALI.....	38
8.2 DISEGNO SPERIMENTALE	42

9. RISULTATI E DISCUSSIONE	46
<i>Bibliografia</i>	<i>53</i>
<i>Ringraziamenti</i>	<i>57</i>

INTRODUZIONE

1 ECOTOSSICOLOGIA

1.1 DEFINIZIONE

L'ecotossicologia è una scienza applicata, volta a valutare l'impatto reale o potenziale sull'ambiente naturale di sostanze derivate dalle attività antropiche, tramite lo studio del meccanismo d'azione degli inquinanti, la misurazione del danno biologico su una o più specie, e la valutazione del danno agli ecosistemi. Per effettuare tali valutazioni ci si avvale prevalentemente di saggi che impiegano sistemi biologici, i quali possono essere impiegati per prevedere l'impatto di una sostanza prima della sua emissione oppure come strumento di controllo per valutare gli effetti provocati dal suo rilascio. In ecotossicologia ha un ruolo importante anche la chimica analitica che permette la rilevazione di specie chimiche preselezionate o di nuovi contaminanti, fornendo una misura dei reali livelli di inquinamento. Questi ultimi possono anche essere stimati sulla base di modelli che consentono di prevedere il destino degli inquinanti nei diversi comparti ambientali. In base ai livelli misurati o previsti, è poi possibile una valutazione del rischio ambientale, tenuto conto dei vari parametri di tossicità misurati dai saggi biologici, cui vengono applicati opportuni fattori di sicurezza. Le sostanze oggetto di studio sono quelle considerate tossiche, o presunte tali, o quelle che possono essere fonte di perturbazione per il sistema nel quale si ritrovano. Un agente viene definito tossico qualora sia in grado di produrre un effetto avverso in un determinato sistema biologico, danneggiandone seriamente la struttura o funzione, o provocandone la morte. La tossicità di una sostanza è quindi una proprietà relativa al suo potenziale effetto dannoso nei confronti di un organismo vivente, e dipende sia dalla sua concentrazione sia dalla durata del periodo di esposizione. Infatti, il contatto di uno xenobiotico con un determinato sistema biologico può non produrre alcuna conseguenza dannosa se la concentrazione è al di sotto di un livello minimo, definito "soglia", o se la durata dell'esposizione è troppo breve (Sanci & Rosa, 1997). Una sostanza tossica può essere introdotta nell'ambiente deliberatamente o accidentalmente e le sorgenti di emissioni inquinanti possono essere di tipo puntiforme (industrie, cantieri, ospedali, impianti di trattamento di acque reflue) o non puntiforme (insediamenti urbani, zone industriali, aree agricole). Quest'ultimo tipo di sorgente è quello più difficile da controllare, dal momento che non sono noti origine e destinazione finale degli inquinanti. Sebbene i contaminanti siano solitamente xenobiotici, in alcuni casi possono essere anche di origine naturale ma in concentrazioni o forma tali da determinare tossicità: un esempio è la liberazione di metalli pesanti in forma solubile a seguito di

attività umane. È bene, inoltre, non soffermarsi esclusivamente su sostanze considerate tossiche, ma considerare anche quelle che possono determinare squilibri trofici nell'ecosistema in cui pervengono, quali nutrienti e sostanze organiche (APAT, 2006).

1.2 OBIETTIVI

L'ecotossicologia si prefigge i seguenti obiettivi:

- sviluppare criteri scientifici che consentano di distinguere i diversi stati caratteristici di ecosistemi, comunità, popolazioni ed individui;
- riconoscere i meccanismi attraverso i quali gli ecosistemi, le comunità, le popolazioni e gli individui passano da uno "stato" all'altro;
- identificare i meccanismi causali che legano i fattori che producono disturbo agli effetti specifici a cui essi danno luogo;
- progredire nell'identificazione di criteri oggettivi attraverso i quali l'integrità di un ecosistema (o delle sue componenti) possa essere valutata e controllata in ogni momento;
- usare tali informazioni per essere in grado di prevedere l'impatto di inquinanti su diversi tipi di ecosistemi (Sanci & Rosa, 1997);
- fornire informazioni utili al legislatore per regolamentare la valutazione e il contenimento dell'impatto ambientale di sostanze e di attività umane;
- aiutare nella formulazione di misure di rimedio ecologico.

1.3 ECOTOSSICOLOGIA ACQUATICA

L'ecotossicologia acquatica è lo studio quantitativo e qualitativo degli effetti di inquinanti di varia natura e origine sugli ecosistemi acquatici o sulle loro componenti. Tali ambienti sono oggetto di particolare preoccupazione dal momento che vi pervengono molti contaminanti, sia per scarico diretto nei corpi idrici, sia per trasferimento da suolo ed atmosfera inquinati.

Il destino di una sostanza è determinato sia dalle intrinseche caratteristiche fisico-chimiche, sia da quelle fisico-chimiche e biologiche del comparto ambientale in cui si ritrova. La temperatura, il pH, la viscosità e il flusso del corpo idrico sono caratteristiche che influenzano in modo non trascurabile il comportamento dell'inquinante, per quanto riguarda sia la distribuzione nella colonna d'acqua, sia la ripartizione nel sedimento, nell'aria e nella componente biotica. Il movimento dello xenobiotico tra le diverse fasi dipende dal suo coefficiente di ripartizione, e mira al raggiungimento della condizione di equilibrio, intesa come la condizione in cui la fugacità della sostanza è uguale per

entrambe le fasi considerate. Il trasferimento è inoltre condizionato dal flusso dell'aria in caso di ripartizione tra acqua e atmosfera, o dalla granulometria e dal contenuto di sostanza organica nel caso di fenomeni di ripartizione tra suolo e acqua (Kendall *et al.*, 2001). Oltre ai vari fenomeni di ripartizione, che regolano solubilizzazione, volatilizzazione e adsorbimento, nelle acque avvengono anche reazioni biotiche o abiotiche quali idrolisi, ossidoriduzione, ionizzazione, fotolisi, biodegradazione. La biodegradazione è la trasformazione biologica di una sostanza complessa in metaboliti più semplici, che in genere risultano essere meno tossici: nell'ambiente acquatico questo processo è il principale responsabile dell'eliminazione degli inquinanti (APAT, 2006).

Il destino e la tossicità di uno xenobiotico sono influenzati anche dalle interazioni di tipo sinergico o antagonistico con altre sostanze presenti nelle acque in cui si ritrovano, che possono essere a loro volta inquinanti o di origine naturale. Gli ambienti acquatici presentano delle caratteristiche peculiari: alcune sostanze non sono volatili ma solubili in acqua (ad esempio i metalli) e molti contaminanti che vengono rapidamente degradati in presenza di aria possono persistere per tempi più lunghi in acqua, grazie al minor contenuto di ossigeno. Gli organismi acquatici sono generalmente limitati all'interno dei confini del loro habitat, pertanto non riescono ad evitare le aree contaminate; inoltre, la loro fisiologia e anatomia presentano caratteristiche che li rendono particolarmente vulnerabili, quali la presenza di branchie e di una pelle altamente permeabile. Altra particolarità: gran parte degli organismi acquatici sono ectotermi; di conseguenza, l'accumulo degli inquinanti e i loro effetti risultano inevitabilmente influenzati dalla temperatura dell'acqua. Infine, i pesci e gli anfibi sono gli unici vertebrati che hanno una fase larvale acquatica che è soggetta a metamorfosi, in più presentano uova non amniotiche, altamente permeabili, nelle quali gli embrioni si sviluppano mentre sono completamente immersi in acqua. Per tali ragioni le fasi embrionali sono particolarmente sensibili ad eventuali insulti chimici (Kendall *et al.*, 2001).

Per alcune sostanze dotate di liposolubilità e scarsa degradabilità, hanno particolare rilevanza i possibili fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione. Il bioaccumulo si realizza perché la sostanza si trasferisce all'organismo acquatico attraverso le branchie e la superficie cutanea, nonché tramite l'alimento ingerito, sovrastando la capacità dello stesso di metabolizzarla ed eliminarla. Al bioaccumulo, attraverso la predazione, può conseguire la biomagnificazione. Tale fenomeno consiste nella progressiva concentrazione ed accumulo degli inquinanti da predato a predatore e,

pertanto, pone particolari rischi a quei predatori che sono al vertice della catena trofica, uomo compreso.

2 IMPATTO AMBIENTALE DEL FARMACO VETERINARIO

Gli animali da allevamento vanno spesso incontro a patologie che vengono trattate o, in alcuni casi, prevenute con la somministrazione di antibiotici ed altri farmaci. Tale condizione risulta più accentuata negli allevamenti intensivi, dove gli animali sono in numero elevato in spazi ridotti, con un aumento di condizioni di stress che rendono l'individuo più vulnerabile a varie patologie le quali, se infettive, si diffondono con maggiore facilità all'interno di allevamenti di questo tipo. Per far fronte a queste circostanze l'impiego di farmaci diventa indispensabile e in alcuni casi, come accade di solito nel pollame, anche adeguatamente programmato. Il farmaco può essere somministrato a scopo terapeutico al singolo animale che presenta necessità, come succede per le mastiti nelle bovine da latte, oppure il trattamento può essere esteso a tutti gli animali con carattere profilattico o metafilattico. L'uso profilattico consiste nel somministrare il farmaco, generalmente mescolato all'alimento, all'intero gruppo di animali, a prescindere dalla comparsa di malattia. Tale utilizzo preventivo è fortemente scoraggiato dalle autorità sanitarie europee e diverrà sostanzialmente proibito a partire dal gennaio 2022, con l'entrata in vigore del nuovo Regolamento UE sul farmaco veterinario che porterà all'abrogazione del, tuttora in vigore, D.Lgs 193/2006. Presumibilmente, tale forma di trattamento resterà consentita solo per la prevenzione di coccidiosi nei polli, tramite l'impiego di anticoccidici. Il trattamento metafilattico consiste, invece, nel somministrare il farmaco all'intero gruppo di animali non appena uno o qualcuno di essi presenti segni di una malattia trasmissibile. Tipicamente si verifica in acquacoltura, tramite somministrazione di mangimi medicati ma, più in generale, può verificarsi in qualsiasi allevamento intensivo e tramite diverse modalità di somministrazione. Per quanto riguarda, infine, i trattamenti auxinici, con piccole quantità di farmaco somministrate quotidianamente a tutti gli animali, e volti ad aumentarne la resa produttiva, senza né scopo terapeutico né profilattico, sono stati banditi in EU a partire dal 2006 perché ritenuti responsabili del diffondersi della farmacoresistenza agli antibiotici. Nonostante ciò, nel 2008 l'allevamento di suini ha rappresentato la destinazione di circa il 60% degli antibiotici (come peso di sostanze attive) venduti in UK e 80% delle dosi di antibiotico in Danimarca. Sempre in Danimarca il dosaggio di antibiotici per i suini è aumentato del 24% tra il 2001 e il 2008 e il DANMAP ha riportato che ai suinetti venivano prescritti dieci o più cicli di tetracicline all'anno e che le tetracicline erano usate in modo sistematico in alcuni allevamenti (Turner, 2011).

A prescindere dallo scopo, qualsiasi trattamento di massa implica l'utilizzo di quantità ingenti di principi attivi, considerate le centinaia di capi che possono essere contemporaneamente trattati. Tali sostanze vengono poi escrete, come tali o sotto forma di metaboliti, tramite le deiezioni degli animali che vengono poi riversate nell'ambiente, spesso senza subire trattamenti, contaminando suoli e acque superficiali. Le principali fonti di dispersione di deiezioni contaminate nell'ambiente sono costituite dallo spargimento di letami o liquami a scopo fertilizzante, o dalle acque provenienti dagli allevamenti ittici, ma anche dalle acque reflue impiegate per la pulizia e disinfezione degli ambienti dove sono presenti gli animali trattati. Relativamente all'acquacoltura è molto facile che vi sia dispersione delle sostanze utilizzate, specie se si considera che alcuni allevamenti ittici non sono isolati dalle acque ambientali (gabbie galleggianti/net-pens) e che non tutto il mangime medicato impiegato viene consumato. Si è calcolato che il 70 – 80% dei farmaci somministrati ai pesci finisce nell'ambiente; inoltre, farmaci in concentrazioni tali da avere attività antibatterica sono stati rinvenuti nei sedimenti situati sotto questi particolari tipi di allevamento (B. Halling - Sorensen, 1997). Gli antibiotici sono tra i composti maggiormente utilizzati per fare fronte alle patologie più comuni nelle specie ittiche, e tra i composti più utilizzati in Italia vi sono amoxicillina, flumechina, ossitetraciclina, sulfametazina e florfenicolo (Lalumera *et al.*, 2003).

Considerato che, generalmente, le concentrazioni raggiunte nell'ambiente sono ben inferiori a quelle terapeutiche si può escludere un rischio diretto per la salute umana, sebbene non possano essere esclusi fenomeni di biomagnificazione lungo la catena alimentare, e di bioaccumulo da parte di vegetali destinati all'alimentazione umana (Boxall, 2004). Ad ogni modo, vi sono comunque possibili conseguenze preoccupanti quali l'insorgenza di farmacoresistenza e l'alterazione degli equilibri interni agli ecosistemi contaminati.

Lo sviluppo di farmacoresistenza è un grave pericolo per la salute umana, in quanto diminuisce notevolmente l'efficacia dei farmaci antibiotici in caso di infezioni da parte di batteri patogeni, che possono portare anche al ricovero o al decesso del paziente. Tre fattori contribuiscono allo sviluppo e alla diffusione di resistenze: mutazioni spontanee che estendono lo spettro di resistenza, trasferimento di geni di resistenza tra microrganismi diversi, aumento di pressione selettiva che stimola lo sviluppo di organismi resistenti. Si può facilmente intuire come la dispersione ambientale di farmaci antibatterici, sia di uso umano che veterinario, provochi un notevole aumento dell'ultima

condizione. Da uno studio sono stati rinvenuti microrganismi resistenti ad alcuni antibiotici nell'acqua, nelle cozze e nei sedimenti marini di tre siti, situati in Marocco: le resistenze a penicillina ed ampicillina erano comuni a tutti i siti, inquinati o meno, ed erano frequenti. Tuttavia, la resistenza batterica ad eritromicina, tobramicina, cloramfenicolo e tetraciclina erano limitate ai siti inquinati da fognature o da effluenti derivanti da macelli. La multiresistenza era frequente: più del 55% dei ceppi resisteva ad almeno un antibiotico e più del 20% presentava plasmidi. La resistenza agli antibiotici nei batteri dei sedimenti è spesso ritrovata in località con allevamenti ittici (Halling - Sorensen, 1997).

L'impatto sugli ecosistemi presenta effetti variegati e difficili da prevedere: a seguito di molte variabili il farmaco può rimanere in loco, formando dei depositi nei quali l'attività microbiologica potrà risultare alterata, oppure può essere distribuito nei vari compartimenti ambientali (suolo, acqua, aria, organismi viventi) e influenzare organismi non target. Infine, i farmaci non sono gli unici contaminanti ambientali ma sono accompagnati da altri farmaci, sostanze di origine agricola e da varie sostanze chimiche di origine industriale con le quali potrebbero esserci fenomeni di interazione, antagonismo o sinergismo. Non va neppure sottovalutata la fitta rete di interazioni presente tra gli esseri viventi appartenenti ad uno stesso ecosistema, che può amplificare ed aggravare le conseguenze di uno squilibrio anche apparentemente contenuto. I lattoni macrociclici (avermectine), ad esempio, possono danneggiare le larve degli invertebrati presenti nel letame anche a concentrazioni piuttosto basse, e suscitare molti effetti subletali su di essi, come ridotta nutrizione, alterazioni osmotiche, riduzione del tasso di crescita, inibizione della pupazione e interruzione dell'accoppiamento. Questo può risultare in un danno indiretto a varie specie, come conseguenza della diminuzione della qualità e della quantità della loro fonte di alimento (Boxall, 2004), oltre ad interferire con la degradazione del letame stesso.

3 TEST DI ECOTOSSICITÀ ACQUATICA E ORGANISMI MODELLO

I test impiegati in ecotossicologia sono di varie tipologie e sono destinati a diversi scopi, i quali spaziano dal monitoraggio degli ecosistemi alla valutazione dell'impatto ambientale di una sostanza. Possono essere effettuati in laboratorio o sul campo, per una singola sostanza o una miscela di sostanze note, oppure su campioni prelevati da un sito di interesse.

Nei saggi condotti in laboratorio, dove le condizioni sono sotto il controllo dello sperimentatore, l'esposizione dell'organismo alla sostanza può essere di tre tipi:

- statica, dove il mezzo contenente la sostanza rimane lo stesso per tutta la durata dell'esperimento;
- semi-statica, nella quale il mezzo subisce rinnovi periodici;
- continua, quando mezzo viene costantemente rinnovato.

Questo tipo di studi permette di definire una relazione causa-effetto; tuttavia, i risultati ottenuti sono validi solo per le condizioni sperimentali utilizzate e non sono estensibili ad altre specie e tantomeno agli interi ecosistemi, in quanto non considerano le complesse interazioni fra biota ed ambiente. Per avere una panoramica della suscettibilità delle diverse specie, è possibile impiegare un certo numero di specie differenti per le quali gli ambiti di sensibilità non si sovrappongono ma risultino complementari. È anche possibile ricorrere all'esposizione sul campo, conducendo gli esperimenti in un'area fisicamente delimitata, nella quale le condizioni risultino parzialmente controllabili dall'operatore. Tali test, particolarmente complessi, permettono di osservare accuratamente le condizioni dell'ambiente studiato, grazie anche al minimo intervento su di esso.

I test di tossicità possono essere distinti nelle seguenti categorie:

- acuti: rilevano effetti avversi che si manifestano entro un breve periodo di tempo a seguito della somministrazione di una singola dose di sostanza;
- subacuti o subletali: considerano effetti dovuti ad un'esposizione di durata di poco inferiore o uguale ad un decimo della vita dell'organismo;
- cronici: stimano gli effetti che hanno luogo in conseguenza di esposizioni che si protraggono per un tempo prolungato, che spesso supera la metà dell'aspettativa di vita dell'organismo impiegato.

Nel caso di danni al genoma, gli effetti vengono considerati cronici anche nel caso in cui il tempo di esposizione sia stato particolarmente breve. Più in generale, possono scaturire effetti cronici anche in seguito ad esposizione acuta e, al contrario, effetti acuti potrebbero manifestarsi anche al principio di un'esposizione cronica.

Nei saggi di laboratorio la scelta della (o delle) specie da impiegare è estremamente importante, e può basarsi sulla selezione di organismi indigeni dell'ambiente da proteggere, eventualmente basandosi sulla loro rilevanza ecologica, economica o sulla facilità di reperimento e semplicità di gestione; in alternativa, si possono impiegare specie modello previste da test standardizzati o che risultino particolarmente sensibili ai contaminanti, oppure che siano gestibili nel laboratorio di cui si dispone (APAT, 2006).

Al fine di ottimizzare la comparabilità, la replicabilità e l'applicabilità dei saggi impiegati in ecotossicologia acquatica sono stati redatti dei protocolli standardizzati da parte di alcuni organismi internazionali, tra cui figurano OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), ISO (International Standardization Organization) e US EPA (U.S. Environmental Protection Agency). In Italia il riconoscimento della validità a livello normativo dei protocolli sperimentali e la scelta delle specie da impiegare nei test di tossicità acquatica è compito dell'IRSA (Istituto di Ricerca sulle Acque) (Sanci & Rosa, 1997).

Gli organismi maggiormente utilizzati nei saggi di ecotossicologia acquatica sono:

- 1- Cellule batteriche: il loro impiego presenta diversi vantaggi quali semplicità e velocità di esecuzione, investimento economico limitato, impiego di volumi esigui di campioni e facilità di standardizzazione delle metodologie test. Tra esse figurano *Vibrio fischeri*, specie batterica bioluminescente impiegata per la valutazione della tossicità acuta di scarichi, acque di vario tipo, sedimenti o sostanze pure (APAT, 2006), e *Spirillum volutans*, batterio acquatico caratterizzato da due fasci rotanti di flagelli localizzati sui poli, utilizzato per eseguire un test di tossicità che prende in considerazione l'inibizione della motilità. Comunque, i tre parametri maggiormente considerati in questo tipo di saggi sono l'inibizione o la stimolazione della crescita, l'attività esterasica e l'attività deidrogenasica. Quest'ultima risulta essere uno dei parametri più sensibili nei confronti della maggior parte delle sostanze chimiche. I microrganismi si ritrovano come comunità all'interno degli ecosistemi, non come

specie singole; perciò, risulta opportuno utilizzare nei test più specie batteriche diverse al fine di effettuare una valutazione di rischio più realistica.

Un ceppo mutante di *V. fischeri* non bioluminescente viene impiegato in un test in cui, a seguito di esposizione a sostanze genotossiche, subisce una reversione alla bioluminescenza; questa viene misurata dopo 8-18 ore con strumentazioni fotometriche (Sanci & Rosa, 1997).

- 2- Alghe: sono presenti diverse alghe unicellulari nei test standardizzati previsti dalle varie organizzazioni. In particolare, l'alga verde *Selenastrum capricornutum* (oggi classificata come *Rapidocelis subcapitata*) è quella maggiormente utilizzata nei test di tossicità acuta; inoltre, è la sola specie raccomandata dall'USEPA ai fini del monitoraggio della tossicità di effluenti. Altre specie sono rappresentate dalle alghe verdi *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella vulgaris*, oltre ad alcune Chrysophyta e cianobatteri (questi ultimi, un tempo assimilati alle alghe in virtù della capacità fotosintetica, sono in realtà un phylum di batteri).

Il saggio più diffuso prevede che le colture algali siano esposte ad almeno cinque concentrazioni differenti di sostanza in esame e che tale esposizione si protragga per 72-96 ore. Si considera quindi il tasso di crescita delle popolazioni ed in seguito al trattamento si osserva la densità cellulare, espressa come cellule/mm³ o cellule/ml (Sanci & Rosa, 1997).

- 3- Piante acquatiche: uno dei vegetali utilizzati è *Lemna minor*, per la quale è previsto un test di inibizione di crescita standardizzato (OECD, 2006), dove gli endpoint considerati sono l'accrescimento, le eventuali alterazioni, il peso secco e/o il peso fresco. In generale i test sui vegetali valutano gli effetti delle sostanze sulla germinazione e sull'allungamento radicale, oppure considerano la variazione della crescita di determinate specie. Va comunque tenuto conto che i tempi e le metodiche variano a seconda della pianta che si utilizza (APAT, 2006).
- 4- Pesci: i test che prevedono il loro impiego presentano molte problematiche per una serie di motivi tecnico-pratici, di conseguenza vi si fa più raramente ricorso: innanzitutto i soggetti scelti non sempre riescono a sopportare adeguatamente le condizioni nelle quali vengono allevati ma, per la riuscita e l'attendibilità dei saggi, è necessario che i pesci siano tutti sani e di dimensioni omogenee; a tutto ciò si aggiungono anche i problemi di spazio, alimentazione e mantenimento che vanno garantiti (APAT, 2006). Infine, trattandosi di vertebrati, ogni utilizzo sperimentale deve essere autorizzato ufficialmente (legislazione a tutela degli

animali da laboratorio). Questo costituisce un'ulteriore difficoltà per chi voglia eseguire dei test ecotossicologici sui pesci.

La normativa italiana prevede l'impiego della trota iridea (*Salmo gairdneri*) per la determinazione dell'accettabilità dello scarico nei corpi idrici superficiali, mentre l'EPA prevede l'utilizzo del ciprinide fathead minnow (*Pimephales promelas*) e del silverside (*Menidia menidia*). I pesci adoperati nei test hanno un'età compresa tra 1 e 90 giorni e viene principalmente tenuto conto della mortalità e/o di endpoint relativi all'attività natatoria (movimenti, velocità, cambi di traiettoria, utilizzo dello spazio, ecc.).

- 5- Crostacei: diversi crostacei sono impiegati in test standardizzati, ma il più utilizzato è *Daphnia magna*. Tale organismo, oltre ad essere semplice da mantenere in coltura, è richiesto dalla normativa per saggi di controllo ambientale e raccomandato dalle principali organizzazioni internazionali che si occupano di problemi di sorveglianza ambientale, le quali hanno provveduto a stilare i protocolli per lo svolgimento dei vari test. I saggi con *D. magna*, oltre alle risposte tossicologiche convenzionali (sopravvivenza), prendono in esame anche risposte più complesse come riproduzione e crescita, che consentono di tracciare, in molti casi, indicazioni di carattere previsionale più realistiche (Sanci & Rosa, 1997). I test standardizzati che impiegano questo organismo sono sia acuti (OECD, 2004), della durata di 48 ore, che cronici (OECD, 2012), con un periodo di esposizione di 21 giorni.
- 6- Altri invertebrati: esistono test per determinare la tossicità e la biodisponibilità di contaminanti presenti in sedimenti di acqua dolce dove vengono impiegati larve di ditteri (*Chironomus tetans* e *C. riparius*): in questi saggi gli end-point di cui solitamente si tiene conto sono la sopravvivenza e la crescita degli organismi al quarto stadio larvale, tramite la determinazione del peso umido o secco, dopo un periodo di esposizione di 10-14 giorni ai sedimenti contaminati. I rotiferi del genere *Brachionus* sono impiegati per un test di tossicità acuta. I mitili vengono invece ampiamente sfruttati per il monitoraggio dei livelli di contaminazione degli ambienti acquatici (Sanci & Rosa, 1997), tenuto conto della loro capacità di filtrare grossi volumi d'acqua e di accumulare talune sostanze inquinanti.

Dal momento che nei test di tossicità acquatica gli organismi sono immersi in una soluzione contenente il contaminante, per l'espressione dei risultati non si utilizza LD50 o ED50, ma LC50 ed

EC50, ovvero le concentrazioni (e non le dosi) letali o efficaci per il 50% dei soggetti. I risultati dei test cronici possono essere espressi anche come MATC, inteso come la massima concentrazione accettabile di sostanza tossica, che rappresenta un livello di concentrazione compreso tra i valori del NOEC e del LOEC. Il NOEC (No Observable Effect Concentration) rappresenta la più alta concentrazione per la quale non è osservabile un effetto significativamente divergente dal controllo, mentre il LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) è la più bassa concentrazione che provoca un effetto divergente dal controllo in modo statisticamente significativo. Tali parametri vengono determinati tramite analisi statistica (Kendall *et al.*, 2001).

4 CHINOLONI E FLUROCHINOLONI

I chinoloni sono chemioterapici ad attività battericida derivati dalla 7-clorochinolona, per purificazione della cloroquina, e il capostipite è l'acido nalidixico, sintetizzato nel 1962. Negli anni 80 del secolo scorso si sono poi ottenuti i 6 - fluorochinoloni, caratterizzati dalla presenza di un atomo di fluoro in posizione 6 che conferisce un notevole incremento di attività e di uptake nella cellula batterica, ampliando di conseguenza lo spettro di attività. Il primo di essi è stato enoxacina, che presenta inoltre un anello piperazinico in posizione 7, il quale forma uno zwitterione con l'acido carbossilico in posizione 3, migliorando la farmacocinetica. In seguito, l'introduzione di un sostituente ciclopropilico in posizione 1 ha permesso un ulteriore ampliamento dello spettro d'azione, mentre si è incrementata l'attività contro *S. aureus* grazie alla sostituzione dell'azoto endociclico in posizione 8 con un atomo di carbonio: si è così ottenuta la ciprofloxacina, uno dei fluorochinoloni più attivi contro i Gram negativi. Tuttavia, un problema comune alla prima e alla seconda generazione è la moderata attività nei confronti di *S. aureus*, con una rapida insorgenza di episodi di resistenza; inoltre, la loro attività nei confronti di organismi anaerobi e *Streptococcus pneumoniae* è insignificante. Pertanto, negli anni 90 è stata sviluppata una terza generazione di chinoloni, comprendente ofloxacina e levofloxacina (Patrick, 2020). Attualmente si ha anche una quarta generazione, alla quale appartengono gemifloxacina e moxifloxacina, la cui attività è ulteriormente incrementata verso gli anaerobi (Gasco *et al.*, 2020).

4.1 MECCANISMO D'AZIONE

Il loro meccanismo d'azione si basa sulla stabilizzazione delle interazioni tra DNA e topoisomerasi procariotiche, inibendo la trascrizione e la replicazione tramite la formazione di un complesso ternario che coinvolge il farmaco, l'enzima e il DNA legato. Le due topoisomerasi coinvolte sono la DNA girasi e la topoisomerasi IV. La DNA girasi (topoisomerasi II) contribuisce a determinare la configurazione spaziale del DNA, condizionando il superavvolgimento della molecola durante la replicazione, eseguendo un taglio ad entrambi i filamenti e in seguito rinsaldandoli. La topoisomerasi IV invece agisce rimuovendo il superavvolgimento e separando le catene appena formate dopo la replicazione del DNA, sempre operando un taglio a doppio filamento.

Il sito di legame dei chinoloni si forma solo quando l'enzima ha iniziato a svolgere la sua funzione e i filamenti di DNA sono pronti per essere attraversati. Quindi quattro molecole di farmaco intercalano il DNA disponendosi in modo che i loro anelli aromatici siano complanari e, mentre i

gruppi carbonilico e carbossilico instaurano legami a idrogeno con il DNA, i sostituenti in C6 e in C7 e lo ione carbossilato creano legami con l'enzima (Patrick, 2020). Per tali ragioni, mutazioni a carico dei geni codificanti per uno o entrambi dei suddetti enzimi possono causare l'insorgenza di resistenza per minor affinità col farmaco: i geni interessati sono *gyrA* e *gyrB*, codificanti per la DNA girasi, *parC* e *parE*, i quali codificano per la topoisomerasi IV. Una mutazione puntiforme provocherà una bassa resistenza, mentre mutazioni in entrambi i geni causeranno una resistenza più elevata. La resistenza può essere anche causata da un'estromissione del farmaco dalla cellula o da una sua minore entrata, associate a variazioni della permeabilità della membrana: è da aspettarsi che tale meccanismo si manifesti con maggiore efficacia nei Gram negativi, che hanno una struttura più complessa nella membrana, piuttosto che nei Gram positivi (Lemke *et al.*, 2014). Si riteneva che la tossicità di questi farmaci fosse selettiva per gli enzimi batterici, difatti quelli eucariotici sono diversi dal punto di vista fisiologico (Carlone & Pompei, 2013), inoltre DNA girasi e topoisomerasi IV sarebbero scarsamente presenti nelle cellule di mammifero; tuttavia, studi recenti hanno rivelato la inesattezza di tale affermazione, come verrà illustrato nella sezione 4.5.

4.2 SPETTRO D'AZIONE E IMPIEGHI TERAPEUTICI

I chinoloni di prima generazione a causa della loro attività limitata ai batteri Gram negativi, delle basse concentrazioni sieriche raggiunte, della loro carente distribuzione a livello tissutale e della loro breve emivita sono confinati al trattamento delle infezioni delle vie urinarie.

I chinoloni di seconda generazione invece, oltre a presentare un potenziamento dell'attività verso i Gram negativi e la comparsa di attività moderata verso i cocci Gram positivi ed alcuni streptococchi, sono caratterizzati da una buona penetrazione cellulare ed un'ampia distribuzione tissutale, garantendo quindi un'azione sistemica. Sebbene norfloxacin sia utilizzata principalmente nelle infezioni urinarie, ciprofloxacina e ofloxacina sono impiegate per infezioni gastrointestinali, delle alte vie respiratorie, prostatiti, infezioni sessualmente trasmesse, osteomieliti croniche, meningiti, endocarditi, sinusiti e otiti. È a questa generazione che appartiene flumechina, farmaco oggetto di questa tesi (vedi più avanti).

Quelli di terza generazione, grazie alla loro eccellente attività nei confronti di batteri Gram positivi come *S. pneumoniae*, sono impiegati per le affezioni delle vie respiratorie.

La quarta generazione presenta un'estensione dello spettro d'azione nei confronti degli anaerobi Gram negativi e Gram positivi e verso gli pneumococchi. (Gasco *et al.*, 2020)

4.3 FARMACOCINETICA E PROPRIETÀ FISICO – CHIMICHE

I chinoloni vengono rapidamente escreti nelle urine mentre i fluorochinoloni sono ben assorbiti quando vengono assunti per via orale e hanno un'eccellente biodisponibilità: si distribuiscono bene nei macrofagi alveolari, nella mucosa bronchiale, nel fluido che riveste l'epitelio polmonare e nella saliva. La concentrazione plasmatica massima viene raggiunta in poche ore e i farmaci sono legati alle proteine plasmatiche in quantità moderata, questo implica un'emivita piuttosto lunga (Lemke *et al.*, 2014). L'emivita varia in base alla molecola considerata e può andare da 3-5 ore (norfloxacin, ciprofloxacina) a 10 ore (pefloxacina, moxifloxacina); alcune presentano un'emivita talmente lunga da consentire un'unica somministrazione giornaliera (sparfloxacina e rufloxacina). La maggior parte dei chinoloni in commercio sono, in genere, scarsamente metabolizzati e vengono escreti principalmente per via renale (Gasco *et al.*, 2020). Essi possono subire glucuronazione del gruppo carbossilico in C3 e introduzione dei gruppi ossidrilici negli anelli eterociclici in C7.

I chinoloni possono produrre specie radicaliche molto reattive perché assorbono nella lunghezza d'onda del visibile. Questi farmaci possono passare al SNC, cosa probabilmente dovuta alla loro lipofilia, e creare un legame coi recettori GABA_A centrali (Lemke *et al.*, 2014).

I chinoloni sono incompatibili coi cationi polivalenti, come Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Al³⁺, poiché il legame tra essi e il carbossile in C3 e il chetone in C4 porta alla formazione di un chelato insolubile (Lemke *et al.*, 2014). Tali chelati sono molto stabili, poco lipofili quindi scarsamente assorbiti a livello intestinale e possono formarsi a seguito di interazioni con altri farmaci, in particolare antiacidi, e col cibo.

4.4 SAR

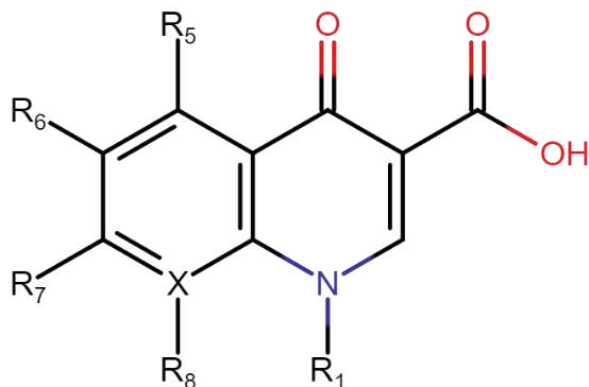


Figura 4. 1 struttura generale dei chinoloni

I chinoloni sono caratterizzati da un nucleo 4-piridonico–3-carbossilato, legato ad un sistema aromatico, che rappresenta il farmacoforo; la riduzione del doppio legame C2-C3 o del chetone in C4 abolisce l'attività, e in posizione C2 non possono esserci sostituenti perché impedirebbero l'accesso al sito di legame per l'enzima. Il carbossile in 3 e il carbonile in 4 non possono subire alcun tipo di modifica in quanto coinvolte nel legame del chinolone al complesso DNA/enzima (Gasco *et al.*, 2020).

Il sostituito in N1 è importante per l'interazione con l'enzima e comunemente consiste in un gruppo etilico o ciclopropilico, ma può anche essere presente un ponte tra N1 e C8 (chinoloni triciclici) che aumenta la potenza del farmaco. Un sostituito ciclopropilico in posizione N1 dei chinoloni permette di ampliare lo spettro di attività rendendoli attivi contro batteri atipici, incluse le specie *Mycoplasma*, *Clamydia* e *Legionella*. Anche l'introduzione di un gruppo 2,4-difluorofenilico sull' N-1 aumenta la potenza antimicrobica, ma i chinoloni con questo sostituito (trovafloxacina e termafloxacina) sono stati ritirati dal mercato a causa degli effetti collaterali (Lemke *et al.*, 2014).

Un gruppo amminico o metilico in C5 permette l'aumento di attività verso i Gram positivi ma sembra incrementare anche l'incidenza di effetti cardiotossici (Gasco *et al.*, 2020). Ad ogni modo, la presenza di un gruppo amminico come sostituito riduce la possibilità di interazioni che riducono l'attività farmacologica, grazie alla sua interazione con il carbonile in 4 che lo rende meno disponibile alla chelazione.

In C6 l'introduzione dell'atomo di fluoro ha incrementato l'inibizione della DNA girasi più di 10 volte e ha ridotto le MIC più di 100 volte rispetto ai chinoloni (Gasco *et al.*, 2020). Inoltre, si aumenta la lipofilia della molecola e quindi la capacità di penetrazione nella cellula batterica, soprattutto per i Gram negativi.

I sostituenti in C7 influenzano lo spettro e la durata d'azione: i gruppi metilici o amminici aumentano l'emivita permettendo una singola somministrazione giornaliera. In alternativa può essere presente un anello eterociclo azotato a 5 o 6 atomi, con l'atomo di azoto direttamente legato al C7. Questi ultimi possono essere:

- gruppi pirrolidinici, che dirigono l'azione verso i Gram positivi;
- anelli ingombranti, contro gli anaerobi;
- gruppi piperazini, contro i Gram negativi. Tali sostituenti però conferiscono alla molecola una maggiore affinità per i recettori GABA_A, con conseguente rischio di insorgenza di convulsioni; l'affinità per questi recettori può essere diminuita con piperazine sostituite da gruppi metilici, che migliorano inoltre l'assorbimento orale e l'attività in vivo (Gasco *et al.*, 2020).

Il sostituito in C8 determina la specificità del bersaglio d'azione: se si tratta di un atomo di idrogeno o di un sostituito che, agganciato alla posizione N1, forma un terzo ciclo il bersaglio principale sarà topoisomerasi IV. Può essere presente un atomo di alogeno che aumenta la penetrazione cellulare di farmaco ma anche la fotosensibilità farmaco-indotta. Una ridotta fotosensibilità si ha invece con la presenza in C8 di un gruppo metossilico, che probabilmente stabilizza il nucleo chinolonico alla luce ultravioletta; il metossile in C8 permette di ottenere inibitori duali e garantisce un aumento dell'attività nei confronti di batteri anaerobi (Gasco *et al.*, 2020). In posizione 8 può anche essere presente un azoto al posto del carbonio per aumentare ulteriormente l'attività.

4.5 TOSSICITÀ

L'elenco degli effetti tossici causati dai chinoloni è particolarmente lungo e variegato ed anche i meccanismi che possono causarli sono molteplici.

Gli effetti collaterali più comuni si hanno a livello gastrointestinale, con sintomi come: nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, e a livello del SNC, con manifestazione di cefalea, vertigini, agitazione, insonnia. Solo occasionalmente si verificano eritema cutaneo e alterazioni della funzionalità epatica (Gasco *et al.*, 2020). In caso di contemporanea assunzione di farmaci antiacidi,

ematinici o integratori alimentari contenenti cationi metallici bi o trivalenti, nel caso non possano essere evitati, è consigliabile somministrarli 4 ore prima o 2 ore dopo l'assunzione dell'antibatterico (Lemke *et al.*, 2014).

Per quanto concerne le loro interazioni coi cationi metallici, tali farmaci si sono rivelati in grado di chelare efficacemente il Fe^{2+} e Fe^{3+} : questo condurrebbe ad un'inibizione dell'attività degli enzimi che necessitano del ferro come cofattore, ad esempio le demetilasi istoniche, le TET DNA demetilasi e la prolil-4-idrossilasi. Come conseguenze vi sono, rispettivamente, l'accumulo di istoni metilati e maggior presenza di 5-metil citosina, con modifiche epigenetiche, e alterazione delle proprietà meccaniche del collagene per la carenza di prolina idrossilata. Vi è inoltre una riduzione dell'espressione di HIF-1 α per inibizione della traduzione del suo mRNA. I chinoloni possono quindi dar luogo a tendiniti, rotture tendinee e a tossicità renale (Badal *et al.*, 2015). Qualora lo ione soggetto a chelazione fosse invece Mg^{2+} , a seguito della riduzione della sua disponibilità a livello delle cartilagini, potrebbe insorgere artropatia indotta da fluorochinoloni. Il deficit intracellulare di magnesio può inoltre portare alla comparsa di insulino resistenza, esponendo i pazienti al rischio di sviluppo del diabete mellito di tipo II (Michalak *et al.*, 2017).

I chinoloni sono composti fotoreattivi e pertanto possono causare fototossicità associata alla formazione di anione superossido e altre specie reattive dell'ossigeno; tale effetto è maggiore per i composti presentanti un alogeno in posizione 8 (lomefloxacin, sparfloxacin) mentre è minimo quando in questa posizione è presente un gruppo metossilico (moxifloxacin) (Gasco *et al.*, 2020). La formazione di ROS può in alcuni casi arrivare a causare stress ossidativo in soggetti con limitata difesa nei confronti di specie chimiche ossidanti (Michalak *et al.*, 2017).

Negli animali giovani è stata inoltre osservata erosione delle giunture soggette a sforzo e, sebbene questo non sembri avvenire nell'uomo, in via precauzionale non vengono somministrati a pazienti di età inferiore ai 18 anni o a donne in età fertile sessualmente attive. Questi farmaci sono anche potenzialmente rischiosi nel primo trimestre di gravidanza per la possibilità che si instaurino acidosi metabolica e anemia emolitica. Un altro effetto collaterale è loro l'attività proconvulsivante che si manifesta, in particolare, quando vengono somministrati assieme ai FANS a seguito della loro capacità di bloccare i recettori GABA α (Lemke *et al.*, 2014).

A livello cardiovascolare per alcuni chinoloni è stato osservato un prolungamento dell'intervallo QT, attribuito al blocco dei canali hERG del potassio e responsabile di aritmie spesso fatali. Alcuni

chinoloni riducono il metabolismo delle xantine per inibizione del CYP1A2; pertanto, in caso di uso concomitante di teofillina si rischia di incorrere in effetti indesiderati da sovradosaggio (Gasco *et al.*, 2020). Negli ultimi anni si è inoltre verificato un aumento di reazioni allergiche a seguito della somministrazione di farmaci appartenenti a questa classe (McGee *et al.*, 2019).

Dal 2015 FDA riconosce come sindrome la FQAD, ovvero la disabilità associata ai fluorochinoloni, caratterizzata da sintomi gravi e cronici che possono coinvolgere il sistema muscoloscheletrico, il sistema cardiovascolare, il sistema nervoso periferico e/o centrale, la cute e i sensi (FDA, 2017). Tale condizione è potenzialmente irreversibile.

Alcuni composti sono stati ritirati dal mercato a causa della loro eccessiva tossicità: temafloxacina provocava emolisi, danno renale e trombocitopenia (sindrome uremico emolitica); trovafloxacina causava una grave tossicità epatica; grepafloxacina causava invece tossicità cardiovascolare; fluorochinoloni con un atomo di cloro in C8, come cinafloxacina e sitafloxacina, si dimostrarono molto efficaci ma vennero ritirati a causa dell'eccessiva fototossicità (Lemke *et al.*, 2014).

La tossicità non si limita agli effetti sull'uomo ma, come già detto in precedenza, essendo la loro azione sulle topoisomerasi non limitata agli organismi procarioti, può manifestarsi in svariati organismi non target, sia vegetali che animali. Ad esempio, è stata rilevata la presenza di DNA girasi in alghe verdi e piante: da uno studio è emerso che *Arabidopsis thaliana* possiede una sequenza omologa a *gyrA* e tre a *gyrB* (Wall *et al.*, 2004). Di conseguenza anche questi organismi fotosintetici subiscono l'azione dei chinoloni in caso di esposizione.

Recentemente si è invece indagato sulla possibile azione antitumorale di alcuni chinoloni, al fine di indentificare molecole con caratteristiche idonee ed eventualmente ottenere derivati da impiegare in questo tipo di patologie. Ne è emerso che tali sostanze possono provocare un'alterazione della normale funzione delle topoisomerasi eucariotiche, in particolare per quelle di tipo II, a cui segue un'inibizione della divisione cellulare e induzione di apoptosi. Tali farmaci possono agire anche come antimitotici e inibitori di chinasi, oppure arrestare il ciclo cellulare tramite altre vie. Ad esempio, lomefloxacina è stata in grado di danneggiare le cellule di melanoma umano COLO829, le quali hanno subito un arresto nelle fasi S e G1/M, facendo ritenere che il meccanismo d'azione fosse appunto l'inibizione delle topoisomerasi II, e la membrana mitocondriale risultava degradata grazie alla formazione di ROS, con conseguente induzione di apoptosi. Ciprofloxacina e moxifloxacina, invece, sono state in grado di indurre apoptosi su cellule di glioblastoma U87MG a seguito di

alterazione della membrana mitocondriale ed arresto del ciclo cellulare alla fase S e sub-G1 (Abdel-Aal *et al.*, 2019). Se da un lato questi risultati positivi sono interessanti, dall'altro evidenziano come un uso improprio di questi farmaci e la loro dispersione negli ecosistemi possano risultare estremamente dannosi anche per gli organismi superiori.

5 FLUMECHINA

5.1 STRUTTURA

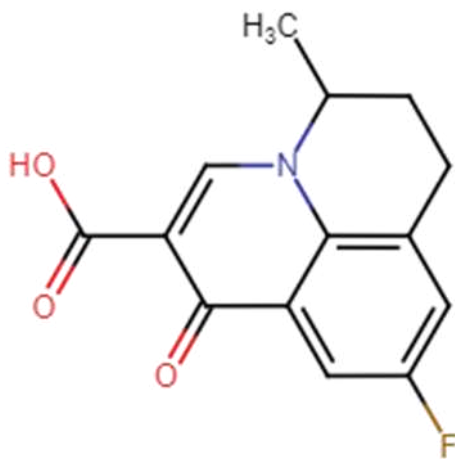


Figura 5. 1 Flumechina

Flumechina è un chinolone di seconda generazione, come si può evincere dalla sua struttura presentante un ponte tra N1 e C8 e un atomo di fluoro in C6, che ne aumenta la lipofilia. In C5 e C7 invece non sono presenti sostituenti.

5.2 UTILIZZI

Lo spettro d'azione di flumechina è esteso a tutti i Gram negativi, di conseguenza essa è ampiamente utilizzata in ambito veterinario. Rappresenta, inoltre, uno dei pochi principi attivi antibatterici il cui uso è approvato in acquacultura: in Italia sono presenti i farmaci Colifarm 200 e Naquilene 500MP, premiscele per alimenti medicamentosi per il trattamento di infezioni da *Aeromonas* e vibriosi. Colifarm 200 contiene 200 mg di flumechina e viene somministrato nel mangime con un dosaggio di 600g/100 kg, pari a 12 mg di principio attivo ogni kg di peso vivo, per cinque giorni. Naquilene 500MP è una contiene invece 500 mg di flumechina per grammo e il dosaggio è di 240 g ogni 100 kg di mangime, che corrispondono sempre a 12 mg di principio attivo per kg di peso vivo. I suddetti farmaci sono approvati anche per l'uso nei suini allo scopo di trattare colibacillosi e salmonellosi. Anche per il pollame sono presenti diverse formulazioni contenenti flumechina, in forme

somministrabili nell'acqua di abbeverata, il cui impiego è previsto per colibacillosi, salmonellosi, pasteurellosi ed altre affezioni dell'apparato digerente e respiratorio sostenute da microrganismi sensibili. Sono poi presenti altre preparazioni, il cui uso è approvato per conigli, suini e bovini, somministrabili per via orale, nel mangime, nell'acqua e per via iniettiva. I prodotti a base di flumechina non possono essere però impiegati in animali produttori di uova o latte destinato al consumo umano (Ministero della Salute, 2021). A seguito dell'impiego in animali produttori di carne e nei pesci sono previsti dei tempi di sospensione, variabili in base all'animale ed al prodotto considerato, che permettono di evitare la presenza di livelli pericolosi di residui. Una fonte di preoccupazione dovuta al largo impiego di flumechina è il suo spargimento nell'ambiente direttamente, come può accadere in acquacoltura, o attraverso la fertilizzazione del suolo agricolo con letami e liquami del comparto zootecnico. L'unico farmaco ad uso umano contenente flumechina presente in Italia era Flumural, attualmente revocato. Infatti, in data 11 marzo 2019, il comitato dei medicinali ad uso umano dell'EMA ha disposto che le autorizzazioni all'immissione in commercio dei farmaci contenenti flumechina, cinoxacina, acido nalidixico e acido pipemidico venissero sospese a causa della comparsa di gravi effetti collaterali a seguito della loro somministrazione (EMA, 2019).

5.3 CHEMODINAMICA AMBIENTALE

Il destino ambientale dei chinoloni dipende da molti fattori, come il tipo di suolo, le condizioni climatiche, il tipo di interazioni con il microbioma e la presenza di altre sostanze chimiche. Essi comunque non sono prontamente biodegradabili e possono adsorbirsi fortemente al suolo e ai sedimenti: questo li rende meno biodisponibili ma, allo stesso tempo, prolunga il tempo necessario per la degradazione (Janecko *et al.*, 2016). La presenza di flumechina può essere rinvenuta nei pressi degli allevamenti ittici dove, essendo somministrata in quantitativi elevati tramite il mangime, viene facilmente dispersa nelle acque circostanti. Una volta presente nell'ambiente acquatico essa può rimanere in soluzione ma, come altri chinoloni, manifesta la tendenza a depositarsi ed adsorbirsi sui sedimenti dove risulta essere particolarmente persistente: fino ad un centimetro di profondità la sua emivita nel sedimento si attesta sui 60 giorni, mentre tra i 5 e i 7 cm la sua emivita si estende oltre i 300 giorni (Hektoen *et al.*, 1995). Nel sedimento può andare incontro a lisciviazione, redistribuzione o, eventualmente, degradazione. La biodegradazione è un fenomeno poco rilevante, sebbene sia stata riportata la sua biotrasformazione a 7-idrossiflumechina e 7-oxoflumechina, con

conseguente riduzione dell'attività antimicrobica, da parte di *Cunninghamella elegans* (Anna J. Williams *et al.*, 2007). La degradazione operata da microrganismi nell'acqua non è significativa, mentre è presente in maniera più marcata nel sedimento, ma rimane pur sempre limitata. Il principale agente di degradazione della flumechina è la luce solare: sperimentalmente, la sua azione risulta più efficace quando il farmaco è in soluzione in acqua (emivita compresa tra 1,9 e 2,9 giorni) rispetto a quando il farmaco è disciolto in acqua mescolata a sedimento (emivita da 3,6 a 14,5 giorni); invece, in assenza di luce la degradazione è praticamente assente (Lai & Lin, 2009). Per tale ragione, nelle zone scarsamente illuminate la persistenza di questo fluorochinolone sarà notevolmente aumentata. In ogni caso, in condizioni abiotiche, la fotodegradazione di tale farmaco pare non aver luogo in acqua dolce, ma solamente in acqua deionizzata e in acqua marina (Pouliquen *et al.*, 2007). Questa sostanza può anche essere assorbita da alcuni organismi, come le piante acquatiche *L. minor* e *L. salicaria* (Cascone *et al.*, 2004) (Migliore *et al.*, 2000), che la sottraggono in tal modo all'ambiente circostante.

5.4 IMPATTO SULL'AMBIENTE ACQUATICO

Sebbene la biodisponibilità dei chinoloni nelle acque dipenda da molte variabili e possa essere ridotta a seguito del loro deposito ed adsorbimento al sedimento, è stato provato che numerosi organismi non target sono sensibili alla loro presenza. Tra questi vi sono pesci, anfibi, crostacei, piante acquatiche e alghe che, quando esposti a bassi dosaggi per periodi prolungati, hanno manifestato alterazioni del loro sviluppo e della loro normale funzione riproduttiva (Janecko *et al.*, 2016). Ad esempio, la pianta acquatica *Lythrum salicaria* esposta a 100 mg/L ha presentato un ridotto sviluppo generale e un minore numero di foglie e di radici secondarie rispetto al controllo. Tali effetti divenivano tanto più marcati quanto maggiore era il tempo di esposizione. Relativamente all'uptake del farmaco le piante di *L. salicaria*, dopo 10, 20 e 30 giorni, presentavano concentrazioni di 64,9, 31,6 e 15,7 µg/g di peso secco (Migliore *et al.*, 2000). Su *Lemna minor*, invece, sono state testate concentrazioni più realistiche, comprese tra i 50 µg/L e i 1000 µg/L: come risultato si è ottenuta una minore produzione di biomassa rispetto al controllo, statisticamente rilevante dopo cinque settimane, ed una riduzione della presenza di clorofilla b. All'aumentare della concentrazione di flumechina aumentavano anche le alterazioni morfologiche, come foglie più piccole e scolorite e radici più corte e, occasionalmente, distaccate dalla pianta. Si suppone che tali effetti fitotossici siano conseguenti all'uptake da parte di *L. minor*; difatti, è stata rinvenuta flumechina in

concentrazioni di 0,72, 2,08, 7,94 e 13,93 µg/g di peso secco rispettivamente per le concentrazioni di 50, 100, 500 e 1000 µg/L di farmaco nel medium (Cascone *et al.*, 2004). Sempre per *L. minor*, la EC₅₀ si è attestata su un valore di 2,470 µg/L e dalla concentrazione di 3 mg/L si è manifestata anche clorosi; nonostante ciò, flumechina è risultata meno tossica rispetto ad altri farmaci della stessa tipologia (levofloxacin, lomefloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, clinofloxacin e ofloxacin) con i quali si osservava insorgenza di clorosi a partire da 125 µg/L (Robinson *et al.*, 2005).

Sono stati condotti dei test anche sul cianobatterio *Microcystis aeruginosa* e sulle alghe verdi *Rhodomonas salina* e *Selenastrum capricornutum* (*Rapidocelis subcapitata*), andando a valutare l'inibizione della crescita; le EC₅₀ per flumechina sono risultate essere rispettivamente 0,159 mg/L, 18 mg/L e 5,0 mg/L. (Lutzhøft *et al.*, 1999). Robinson *et al.* (2005) hanno ottenuto risultati simili per *S. capricornutum* (*P. subcapitata*), mentre per *M. aeruginosa* la EC₅₀ di flumechina è risultata essere 1,96 mg/L: tale differenza è probabilmente dovuta alla più ridotta durata del test (3 giorni invece che 7). Il pesce *P. promelas*, in fase larvale, non si è rivelato particolarmente sensibile alla presenza di fluorochinoloni fatta eccezione per clinafloxacin che, alla concentrazione di 10 mg/L, causava una mortalità quasi del 100%.

Su *Daphnia magna* sono stati condotti diverse tipologie di test per questi farmaci. In uno di 48 ore in cui sono stati testati i fluorochinoloni sopra elencati alla concentrazione di 10 mg/L, la mortalità non ha superato il 10% (statisticamente non significativa). Tuttavia, con flumechina e clinafloxacin si è manifestato un insolito comportamento letargico: circa il 10% dei neonati, infatti, o si muoveva lentamente o muoveva le appendici solo a seguito di sollecitazione (Robinson *et al.* 2005). Successivamente sono stati riportati degli effetti tossici ritardati conseguenti all'esposizione acuta a flumechina, levofloxacin ed enrofloxacin: continuando per dieci giorni l'osservazione di soggetti sopravvissuti al test di immobilizzazione acuta previsto dal protocollo (OECD, 2004), ponendoli in un medium privo di farmaco, si è osservata mortalità ritardata e drastica riduzione della produzione di uova; come risultato, la EC₅₀ per tale test è risultata notevolmente diminuita per tutti e tre i farmaci (flumechina da 25,35 mg/L a 7,5 mg/L; enrofloxacin da 16,72 mg/L a 3,13 mg/L; levofloxacin da più di 40 mg/L a 15,11 mg/L) (Tolosi & De Liguoro, 2021). Per la flumechina, la tossicità ritardata era stata precedentemente evidenziata anche in seguito ad esposizione embrionale dei dafnidi, con effetti significativi sulla sopravvivenza e sulla capacità riproduttiva (De Liguoro *et al.*, 2019). Invece, l'esposizione cronica per tre settimane dopo la nascita, secondo il test standard di inibizione della

riproduzione, aveva generato una LOEC di 0,75 mg/L ed una EC₅₀ pari a 1,2 mg/L (Zounkovà *et al.*, 2011). Infine, su questo organismo sono stati effettuati studi multigenerazionali che hanno permesso di evidenziare la tossicità transgenerazionale della flumechina, con manifestazione di alterazioni della riproduzione ed aumento della mortalità anche su quei soggetti che non erano più esposti al farmaco da ben tre generazioni (De Liguoro *et al.*, 2019).

6 Daphnia magna Straus

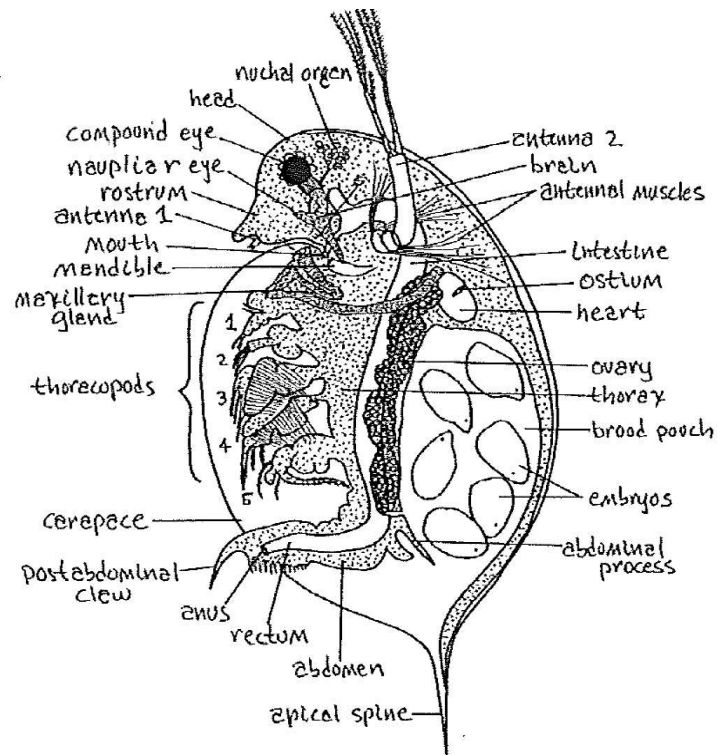


Figura 6.1 Daphnia magna (Freeman and Bracegirdle 1971)

Classe *Branchiopoda*

Ordine *Cladocera*

Famiglia *Daphniidae*

Genere *Daphnia*

Daphnia magna è un crostaceo di acqua dolce di piccole dimensioni (non supera i 5 mm di lunghezza) con forma ovalare, compressa lateralmente. In natura essa vive in luoghi d'acqua dolce: fiumi, laghi, stagni, ruscelli, paludi e acque leggermente salmastre. È caratterizzata da un carapace a struttura bivalve che racchiude l'intero organismo ad eccezione del capo. Quest'ultimo presenta un singolo occhio composto, fortemente pigmentato, che si forma durante l'ultima parte dello sviluppo embrionale, nonché un ocello di dimensioni minori e due paia di antenne di cui le seconde, biramose e molto sviluppate, hanno funzione natatoria. Il sistema nervoso è caratterizzato da un ganglio cerebrale che è localizzato vicino all'occhio (Sanci & Rosa, 1997).

La trasparenza del carapace permette di osservare alcuni organi interni: il cuore, localizzato dorsalmente nella regione postcefalica, l'intestino medio, chiaramente visibile quando contiene materiale alimentare, e gli ovari, situati lateralmente ad esso. La regione toracica, anch'essa racchiusa nel carapace, è dotata centralmente di cinque paia di appendici (arti toracici) provvisti di setole, a funzione filtrante, deputate alla raccolta delle particelle alimentari disperse in acqua. Queste ultime, una volta filtrate sono trasferite all'apertura orale, triturate dall'apparato boccale e passate all'intestino per la digestione (Russo, 2008). Gli organismi appartenenti alla famiglia dei dafnidi sono filtratori. Il loro cibo è costituito da alghe, batteri, protozoi e particelle di detrito organico (Sanci & Rosa, 1997).

Il flusso d'acqua creato dagli arti toracici è importante sia per la nutrizione che per la respirazione. In *D. magna* vi sono due flussi che operano in modo alternato: uno laterale proveniente dal secondo paio di arti toracici che fluisce lungo il carapace e uno mediano che fluisce tra gli arti toracici. La frequenza dei movimenti delle appendici utili a creare tali flussi è di 470 cicli al minuto. Tuttavia, ad elevate concentrazioni di cibo, *D. magna* diminuisce la frequenza con cui gli arti toracici si muovono, per mantenere l'assunzione di nutrienti costante: il tasso di filtrazione è compreso tra gli 0,3 e 1,8 ml/h.

L'intestino è costituito da stomadaeum (esofago) che continua nel mesenteron (intestino medio) e infine nel proctadaeum (parte terminale). Non ha convoluzioni, ma presenta due diverticoli ciechi sulla parte dorsale del mesenteron. Il lume intestinale è intensamente ricoperto da microvilli, permettendo all'animale di assimilare adeguatamente i nutrienti nonostante il rapido passaggio del cibo. Le evacuazioni, infatti, sono frequenti: avvengono ogni 30-35 minuti.

Per *D. magna* alcuni elementi sono essenziali:

- il calcio prende parte in molti processi biologici, come la proliferazione cellulare, la trasduzione del segnale e la contrazione muscolare;
- il sodio è importante per la regolazione osmotica;
- il rame ha una concentrazione ottimale compresa tra 1-35 µg/L;
- il ferro è un costituente dell'emoglobina, quindi è necessario per il corretto trasporto di ossigeno;
- il selenio deve essere presente in una concentrazione minima di 0,1 ppb per poter supportare una coltura di *D. magna*. Al di sotto di tale soglia il crostaceo perde progressivamente i segmenti distali delle antenne durante le mute, manifestando deterioramento del carapace e una riduzione

dell'aspettativa di vita. La deprivazione di selenio causa, inoltre, alterazioni sia dei mitocondri, sia del reticolo sarcoplasmatico e quindi lisi delle fibre muscolari nelle antenne. Questo perché il selenio è necessario per la glutatione perossidasi, in assenza della quale si hanno danni dovuti a perossidazione (Smirnov, 2014).

Il colore della dafnia è conseguenza del cibo predominante nella dieta; ad esempio quelle che si nutrono di alghe verdi saranno trasparenti con una colorazione giallo-verde. Possono tuttavia assumere una colorazione rossastra in caso di carenza di ossigeno.

I Cladoceri hanno una circolazione sanguigna aperta. Il cuore ha un'apertura laterale che permette l'entrata dell'emolinfa e un breve vaso collocato anteriormente dal quale essa è espulsa ad ogni contrazione cardiaca. Alla temperatura di 20°C il battito è di circa 200 contrazioni per minuto, ma questo valore tende ad abbassarsi con il calo della temperatura ambientale. Sono presenti membrane che dividono il flusso venoso da quello arterioso nella zona cardiaca, mentre l'intero corpo è suddiviso, tramite membrane, in tre spazi dove si riversa l'emolinfa: la lacuna ventrale, la lacuna dorsale e la lacuna intestinale. L'emolinfa è di color giallo chiaro ma al suo interno presenta emoglobina, che in alcune circostanze può renderla rossastra (Smirnov, 2014): in caso di carenza di ossigeno *D. magna* può infatti incrementare la quantità di emoglobina in modo da ottimizzarne il trasporto.

Vivendo in un ambiente ipotonico, in quanto animale di acqua dolce, la dafnia ha la capacità di assorbire attivamente ioni, e le ghiandole presenti nel guscio possono avere un ruolo nell'escrezione e nell'osmoregolazione, che per essa è fondamentale.

Per proteggersi da attacchi di parassiti e patogeni *D. magna* presenta come prima linea difensiva il carapace e l'epitelio, i quali agiscono da barriera. Per le evenienze nelle quali tale barriera difensiva non dovesse essere sufficiente, *D. magna* possiede un efficiente sistema immunitario innato, meno selettivo rispetto ad un sistema immunitario adattativo ma più rapido. I geni dell'immunità innata della dafnia ricadono in tre gruppi funzionali:

- riconoscimento dei patogeni: tramite recettori per il riconoscimento dei patogeni (PRR), deputati ad indentificare pattern presenti sulla superficie di microrganismi (ad esempio il peptidoglicano) sia eucarioti che procarioti e ad avviare la risposta immunitaria;
- regolazione dell'immunità: tramite recettori impiegati nella trasduzione del segnale;

-attacco: consistente sia in difese di tipo cellulare (fagocitosi operata da emociti), sia di tipo umorale (enzimi, specie reattive dell'ossigeno) (Smirnov, 2014).

L'accrescimento della dafnia avviene per stadi, con rigetto ad ogni muta del vecchio esoscheletro che viene sostituito con uno di nuova formazione. Nella femmina sessualmente matura l'esoscheletro viene abbandonato dopo ogni parto. Presentano dimorfismo sessuale, in particolare per quanto riguarda le dimensioni: le femmine raggiungono i 4-5 mm di lunghezza corporea allo stadio adulto, mentre i maschi non superano i 2-3 mm (Sanci & Rosa, 1997).

Nel ciclo vitale di *D. magna* (60-100 giorni a 20°C) possono essere descritte due modalità riproduttive che dipendono dalle condizioni ambientali. Quando queste sono favorevoli la popolazione è costituita da individui di sesso femminile in grado di riprodursi per partenogenesi: entro 7-10 giorni dalla nascita *D. magna* dà luogo alla prima schiusa, composta in media da una decina di individui. Il numero di individui aumenta nelle schiuse successive, collocandosi tra i 20 e i 50 individui, a seconda delle condizioni ambientali e dello stato nutrizionale (Sanci & Rosa, 1997).

Le uova, maturate nei due ovari, passano nella camera di incubazione localizzata dorsalmente, dove completano lo sviluppo in circa tre giorni. Poco dopo il rilascio dei neonati, la femmina muta e depone un nuovo gruppo di uova nella camera di incubazione riattivando il ciclo (Russo, 2008).

Viceversa, in condizioni sfavorevoli si ha la riproduzione sessuata: da alcune uova partenogeniche nascono individui di sesso maschile e contemporaneamente alcune femmine producono un diverso tipo di uova, a corredo aploide, in numero massimo di due. A fecondazione avvenuta il carapace della femmina si scurisce e si ispessisce a livello della camera di incubazione, avvolgendo le uova fecondate in una struttura protettiva detta efippio, che verrà abbandonata alla successiva muta unitamente all'esoscheletro. Dall'efippio potranno schiudersi uno o, più raramente, due individui di sesso femminile (Sanci & Rosa, 1997).

Le ragioni per cui le specie del genere *Daphnia* sono scelte per condurre test di ecotossicologia acquatica sono di ordine sia pratico che scientifico:

- sono ampiamente distribuite negli ambienti acquatici;
- costituiscono una fonte di cibo per molte specie di pesci;
- posseggono un ciclo vitale relativamente breve e possono essere mantenute in condizioni di laboratorio;
- sono sensibili ad un'ampia gamma di contaminanti acquatici;

- sono di dimensioni ridotte, permettendo così di ottenere popolazioni sufficientemente numerose in quantità d'acqua ridotte (50 individui adulti in 750 ml);
- il loro carapace è trasparente e permette di vedere chiaramente sia gli organi interni, come cuore e intestino, sia le uova prodotte nella camera incubatrice dorsale;
- la riproduzione partenogenetica consente di ottenere popolazioni composte da individui con patrimonio genetico virtualmente identico, permettendo di escludere la variabilità dovuta alla riproduzione sessuata.



Figura 6.2. *D. magna* con embrioni nella camera di incubazione



Figura 6.3. *D. magna* con efioppio in sviluppo

6.1 MANTENIMENTO IN COLTURA DI *Daphnia magna*

Per condurre questo studio si sono mantenuti gli individui in vasche di vetro con 750 ml di acqua oligominerale Rocchetta© addizionata di selenio (300 µL di una soluzione da 50 mg/L di Na₂SeO₃), poste in un incubatore mantenuto alla temperatura di 20°C ±1 e con un fotoperiodo di 16 ore di luce (circa 100 lux) giornaliera. Una corretta alternanza luce-buio è fondamentale per il mantenimento del ciclo partenogenico.

Ogni vasca contiene 50 dafnie adulte, al fine di evitare sovrappopolazione e conseguente sviluppo di efippi. Gli esemplari vengono nutriti a giorni alterni, in coincidenza col rinnovo del mezzo di coltura, tramite aggiunta di una sospensione dell'alga verde unicellulare *Scenedesmus dimorphus*, in modo da ottenere una concentrazione finale di 400'000'000 cell/mL. Ogni ciclo di allevamento viene fatto durare 30 giorni perché successivamente la quantità e la qualità di figlie generate potrebbero essere non ottimali a causa dell'età della madre. La dafnia deve essere almeno al terzo parto ed avere non più di trenta giorni per garantire la produzione di una progenie ottimale, quale quella necessaria per avviare una nuova coltura o un test di tossicità.

7 SCOPO DELLA TESI

Si è parlato della presenza di protocolli standardizzati per l'esecuzione di test ecotossicologici sia acuti che cronici, i quali però limitano l'osservazione degli effetti sull'organismo modello alla sola durata del test, impedendo così l'osservazione di eventuali fenomeni di tossicità ritardata, multigenerazionale e transgenerazionale, col rischio di sottostimare l'impatto ambientale della sostanza considerata. È infatti emerso, da precedenti studi, che vi sono farmaci, in particolare appartenenti alla classe dei chinoloni, i cui effetti tossici in *Daphnia magna*, insorgono alcuni giorni dopo il termine dell'esposizione acuta (Tolosi & De Liguoro, 2021), possono incrementarsi lungo le generazioni (Dalla Bona *et al.*, 2016) o comparire perfino in quarta generazione, a seguito di un'esposizione limitata alla prima generazione (De Liguoro *et al.*, 2019). In questa tesi, in particolare, si cercherà di approfondire lo studio della tossicità transgenerazionale della flumechina. Il farmaco è stato commercializzato precedentemente all'entrata in vigore delle Direttive che impongono la valutazione del rischio ambientale nel dossier per ottenere l'AIC (Direttiva 81/852/CEE successivamente modificata da 99/18/EEC) ed è ampiamente usato in acquacoltura, dove viene impiegato sotto forma di mangime medicato. Come precedentemente riportato, a tale pratica consegue una inevitabile dispersione di flumechina nell'ambiente acquatico e vi è quindi un'elevata possibilità che essa interagisca con i vari organismi presenti nell'ecosistema.

Nel presente studio verrà saggiata anche una concentrazione (0,2 mg/L) di un ordine di grandezza inferiore a quella precedentemente impiegata (2 mg/L), e si utilizzerà, per ogni generazione un numero di esemplari (100) cinque volte superiore a quello tradizionalmente utilizzato (20), in modo da aumentare il potere statistico del saggio e, al contempo, fornire una massa di organismi tale da consentire un campionamento adeguato per successivi studi di tossicità a livello molecolare. L'obiettivo finale è infatti quello di verificare se gli effetti (inibizione dello sviluppo e della riproduzione) rilevati in quarta generazione dopo tre generazioni mantenute in medium puro, siano la conseguenza della capacità del farmaco di interferire con il corredo genetico di *D. magna*. Tale ipotesi ha ragione di essere, sia per il ritardo con cui gli effetti tossici della flumechina si manifestano, sia per il meccanismo d'azione del farmaco in esame che è centrato sull'inibizione di enzimi che hanno un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi degli acidi nucleici.

PARTE SPERIMENTALE

8 MATERIALI E METODI

8.1 MATERIALI

Flumechina

L'antibatterico flumechina in polvere, di purezza $\geq 97\%$, è stato fornito da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Con tale farmaco è stata allestita una soluzione madre in medium di coltura, alla concentrazione di 100 mg/L. La soluzione madre è stata conservata, al riparo dalla luce, alla temperatura di 4°C. Le due soluzioni di flumechina utilizzate negli esperimenti, rispettivamente pari a 0,2 e 2 mg/L, sono state ottenute diluendo adeguatamente la soluzione madre nel medium di coltura.

Medium di coltura

Il medium per l'allevamento di *D.magna* era costituito da acqua minerale naturale Rocchetta© addizionata di Na_2SeO_3 in modo da ottenere una concentrazione finale di 0,01 mg/L. La temperatura di utilizzo era di $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Le caratteristiche chimiche dell'acqua Rocchetta sono riportate in Tabella 8.1.

pH	7,61
Residuo fisso a 180°C	181,6 mg/L
Sostanze disciolte espresse in ioni (mg/L):	
Ca^{2+}	60,36
Na^+	3,87
Mg^+	3,73
K^+	0,35
Sr^+	0,13
HCO_3^-	185,4
SO_4^{2-}	7,54
Cl^-	7,34
NO_3^-	1,38
F^-	0,14
SiO_2	5,19

Tabella 8.1 Caratteristiche dell'acqua Rocchetta© (Università degli Studi di Camerino, 7 giugno 2018)

Daphnia magna

L'organismo modello utilizzato nei test è stato il crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna*; le colture, facenti parte di un unico clone generato in laboratorio, sono mantenute in vaschette di vetro contenenti 750 ml di medium, poste in incubatore refrigerato alla temperatura costante di 20°C ±1, con un fotoperiodo di 16/8 ore luce/buio. Il buono stato di salute della coltura è regolarmente testimoniato dalla bassa mortalità (≤ 2% per settimana), dall'alta capacità riproduttiva (circa 10 neonati al giorno per soggetto) e dalla assenza di epippi o di individui di sesso maschile.

Bold Basal Medium

Il Bold Basal Medium (BBM) è il medium impiegato per la coltura di *Scenedesmus dimorphus* ed è costituito da acqua deionizzata alla quale vengono aggiunte soluzioni saline in concentrazioni prestabilite (Tabella 8.2). Prima di essere utilizzato viene sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti.

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE	VOLUME aggiunto per 1 L BBM	CONCENTRAZIONE FINALE (M)
NaNO ₃	25 g/L	10 ml	2,94 x 10 ⁻³
NaCl	2,5 g/L	10 ml	4,28 X 10 ⁻⁴
CaCl ₂	2,57 7g/L	10 ml	1,70 X 10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA	5 g/L	10 ml	1,71 x 10 ⁻⁴
KOH	3,1 g/L	10 ml	5,53 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17,5 g/L	10 ml	1,29 x 10 ⁻³
K ₂ HPO ₄	7,5 g/L	10 ml	4,31 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄	7,5 g/L	10 ml	3,04 x 10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	11,42 g/L	1 ml	1,85 x 10 ⁻⁴
FeSO ₄	4,98 g/L	1 ml	1,79 x 10 ⁻⁵
Oligoelementi		1 ml	

Tabella 8. 2. Composizione salina del Bold Basal Medium

Scenedesmus dimorphus

Si tratta di un'alga verde unicellulare d'acqua dolce che viene coltivata in laboratorio (Figura 7) al fine di impiegarla come nutrimento per *D. magna*. Le cellule hanno forma affusolata e sono di colore verde brillante, grazie all'abbondante presenza di cromatofori; i cloroplasti contengono clorofilla a, b, betacarotene e varie xantofille. Al microscopio ottico, le cellule possono presentarsi singolarmente, oppure aggregate in quartetti o ottetti uniti nella parte centrale dei fusi. Le forme aggregate corrispondono alle fasi di intensa replicazione cellulare.

Gli stock algali da utilizzare nell'alimentazione di *Daphnia magna* vengono preparati come segue: all'interno di un pallone di vetro si pongono 1 L di BBM, 1,5 g di bio-pollina sterile, 1,5 ml di vitamine (0,1 mg/L vitamina H, 20,0 mg/L B1 e 0,1 mg/L B12) e 2,5 ml di una sospensione algale di 400 milioni di cellule/mL. Si mantiene un'illuminazione continua, con un'intensità di 4000 lux, fornita da lampade fluorescenti "cool white" ed una temperatura di $25\pm 1^\circ\text{C}$. All'interno del pallone viene continuamente insufflata aria filtrata in modo da evitare la sedimentazione delle cellule algali. Dopo 4-5 giorni, quando la coltura assume un colore verde sufficientemente intenso, si aggiunge un altro litro di BBM, 1,5 g di pollina e 1,5 ml di vitamine, per ottenere un volume finale pari a due litri. La coltura viene mantenuta per ulteriori due giorni, fino ad ottenere una densità cellulare pari a circa 9-10 milioni di cellule per millilitro, testimoniata da un colore verde scuro intenso e brillante. A questo punto la coltura viene raccolta, filtrata su un setaccio da 50 μm per eliminare i residui di pollina, e una minima aliquota viene diluita 1:10 in acqua per procedere alla conta cellulare. La conta si effettua al microscopio ottico impiegando la camera di Burker, caratterizzata da nove celle principali a loro volta suddivise in sedici celle più piccole. Si immettono, tra la camera e il vetrino copri-oggetto, 10 μl della sospensione diluita e si procede alla conta di almeno tre celle principali disposte in diagonale. Nel caso in cui vi sia una differenza eccessiva tra una cella e l'altra è necessario ripetere completamente l'operazione, in quanto può indicare scarsa omogeneità della sospensione o sua inadeguata distribuzione nella camera. Per risalire al numero di cellule/ml nella coltura originale, si moltiplica per 10.000 (Burker factor) il numero medio di cellule per cella principale, e poi per 10 che è il fattore della diluizione che precede la conta.

Dopo la conta cellulare, si distribuisce il filtrato dell'intera coltura in provette da 50 ml che vengono centrifugate a 3000 RPM per 7 minuti a 4°C (centrifuga 5810 R Eppendorf) in modo da far

sedimentare l'alga sul fondo. Si elimina quindi il surnatante e ciascun pellet *algale* viene risospeso in BBM diluito 1:4. Il volume di BBM diluito da aggiungere è calcolato tramite la seguente formula:

$$\frac{n^{\circ}alghe (media) * 10 * 10'000 * 50ml}{400'000'000}$$

Nella formula, 10 è il fattore di diluizione utilizzato per la conta cellulare, 10'000 è il fattore di Burker, 50 ml il volume iniziale a cui si fa riferimento e 400'000'000 di cellule/ml la concentrazione desiderata per lo stock algale. Infine, l'alga risospesa viene riportata in una singola provetta da 50 mL e conservata a 4°C, al riparo dalla luce. In queste condizioni le cellule si mantengono vitali per almeno 30 giorni e possono essere utilizzate sia come nutrimento per *D. magna*, sia per avviare nuove colture algali.

In ogni vaschetta di coltura (contenente 750 ml di medium) vengono tenute 50 dafnie. Si parte con individui neonati (<24 ore di vita) e per tre volte a settimana (lunedì, mercoledì, venerdì) si somministra l'alimento, in quantità che aumentano in rapporto alla crescita dei dafnidi. In particolare, della sospensione da 400'000'000 cellule/ml si somministrano: 1,5 ml fino al quarto giorno, 2 ml al settimo e al nono giorno e 2,5 ml successivamente (dafnie ormai adulte).



Figura 8. 1. Coltura di *S. dimorphus*

8.2 DISEGNO SPERIMENTALE

Nel presente studio si sono impiegate quattro generazioni consecutive di *Daphnia magna*, denominate F0, F1, F2 e F3. Per avviare il test su F0 si sono prelevati (dalle colture di mantenimento presenti in laboratorio) un totale di trecento individui con meno di ventiquattro ore di vita, che sono stati separati in modo casuale in tre gruppi da cento, ciascuno distribuito in 2 vaschette con 50 individui ciascuna. Un gruppo è stato designato come controllo, e posto in medium puro, un gruppo è stato posto in medium contenente 0,2 mg/L di flumechina e l'altro è stato posto in medium contenente 2 mg/L di flumechina. L'esposizione dei due gruppi 'trattati' alle già menzionate concentrazioni di farmaco è stata continua lungo i 21 giorni di durata del test.



Figura 8. 2. Generazione F3 e colture di mantenimento in incubatore

Per le generazioni F1, F2 e F3, invece, nessuno dei 3 gruppi veniva esposto al farmaco. I neonati utilizzati per i test su ciascuna di queste generazioni (sempre tre gruppi di 100 esemplari distribuiti in 2 vaschette con 50 individui ciascuna), venivano prelevati dalle vaschette della generazione precedente al termine del test (21 giorno), mantenendo l'identità originale di ex controllo, ex-esposti 0,2 mg/L ed ex-esposti 2 mg/L. In tutte le generazioni il medium veniva rinnovato tre volte a settimana (lunedì, mercoledì e venerdì), e nella stessa occasione veniva somministrato l'alimento. Subito prima di effettuare tali operazioni, da ciascuna vaschetta venivano prelevati e contati i nuovi nati e gli eventuali soggetti deceduti, e rilevati possibili indici di stress quali la presenza di efippi o di soggetti trasparenti, ed eventuali alterazioni del comportamento.

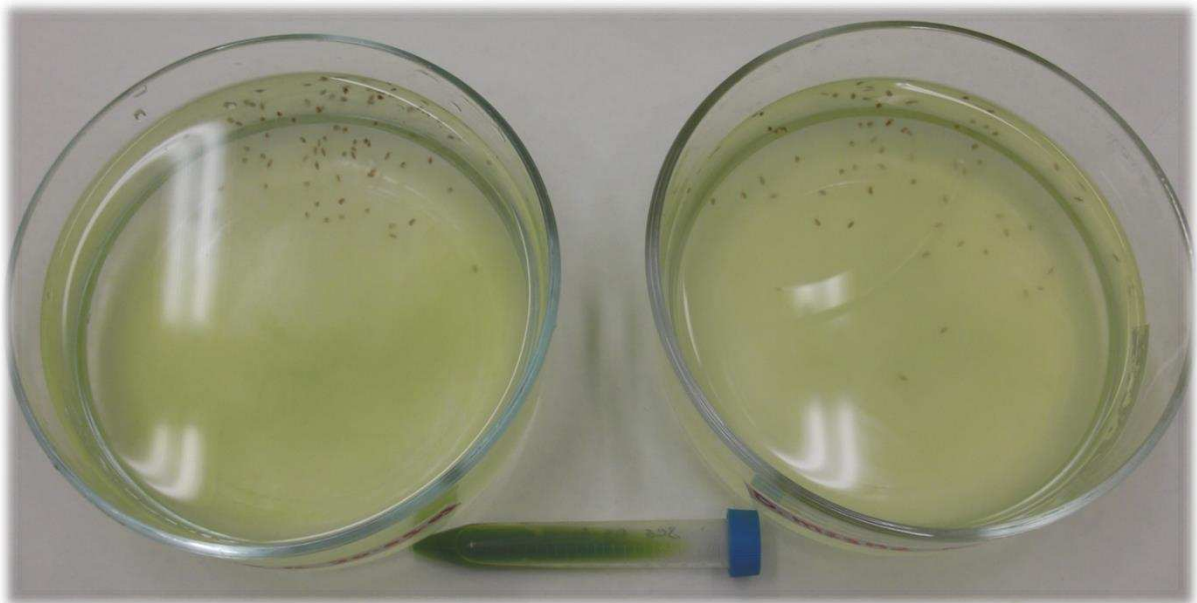


Figura 8. 3. Vaschette di allevamento

Al termine di ogni test (ventunesimo giorno), venivano prelevati a random, da ciascun gruppo sperimentale, venti esemplari adulti che venivano fissati in una soluzione di etanolo al 70% al fine di misurarne la lunghezza e valutare eventuali effetti sulla crescita. La misurazione veniva eseguita fotografando i soggetti di ciascun gruppo accanto ad un calibro di riferimento e analizzandone successivamente l'immagine con il software Photoshop®.

In F0 e F3, al termine del test, i soggetti appartenenti sia ai gruppi sperimentali che a quello di controllo sono stati prelevati al fine di procedere, in un secondo tempo, all'estrazione di DNA e di RNA per studi di carattere biomolecolare. Affinché non vi fossero problemi nei successivi step di estrazione legati alla presenza dell'alga nell'intestino delle dafnie e di uova nella camera di covata, le adulte di F0 e F3 sono state prima messe in medium privo di alga dal ventesimo al ventunesimo giorno e successivamente sono state eliminate le eventuali uova, ponendo i soggetti su un vetrino sotto lo stereomicroscopio e aprendone quindi il carapace lungo il dorso con l'aiuto di due aghi. I materiali impiegati in questa operazione erano costantemente mantenuti puliti con alcol etilico ed RNaseZap®. In seguito, le dafnie, prive o private delle uova, venivano poste in azoto liquido per poi procedere, in un secondo momento, all'estrazione degli acidi nucleici.



Figura 8. 4. Coltura di *D. magna*

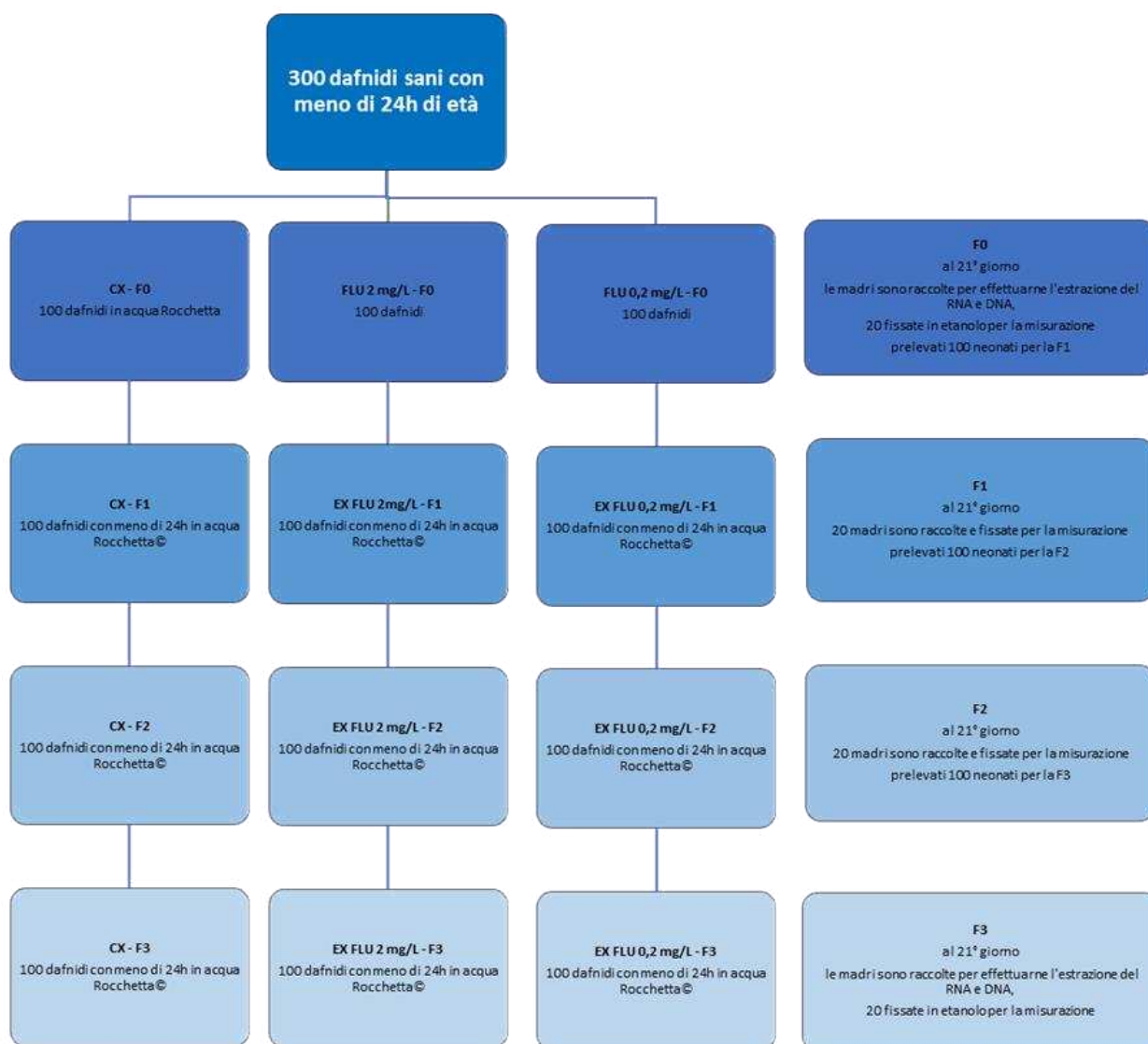


Tabella 8.3. Disegno sperimentale

9. RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati ottenuti in questo studio sono stati sottoposti al test t di Student, per valutare la significatività della differenza tra le medie dei gruppi sperimentali e dei controlli. Per quanto riguarda lo sviluppo dei soggetti è risultata evidente la mancanza di differenze significative tra i vari gruppi appartenenti alla stessa generazione, come mostrato nel grafico 9.1.

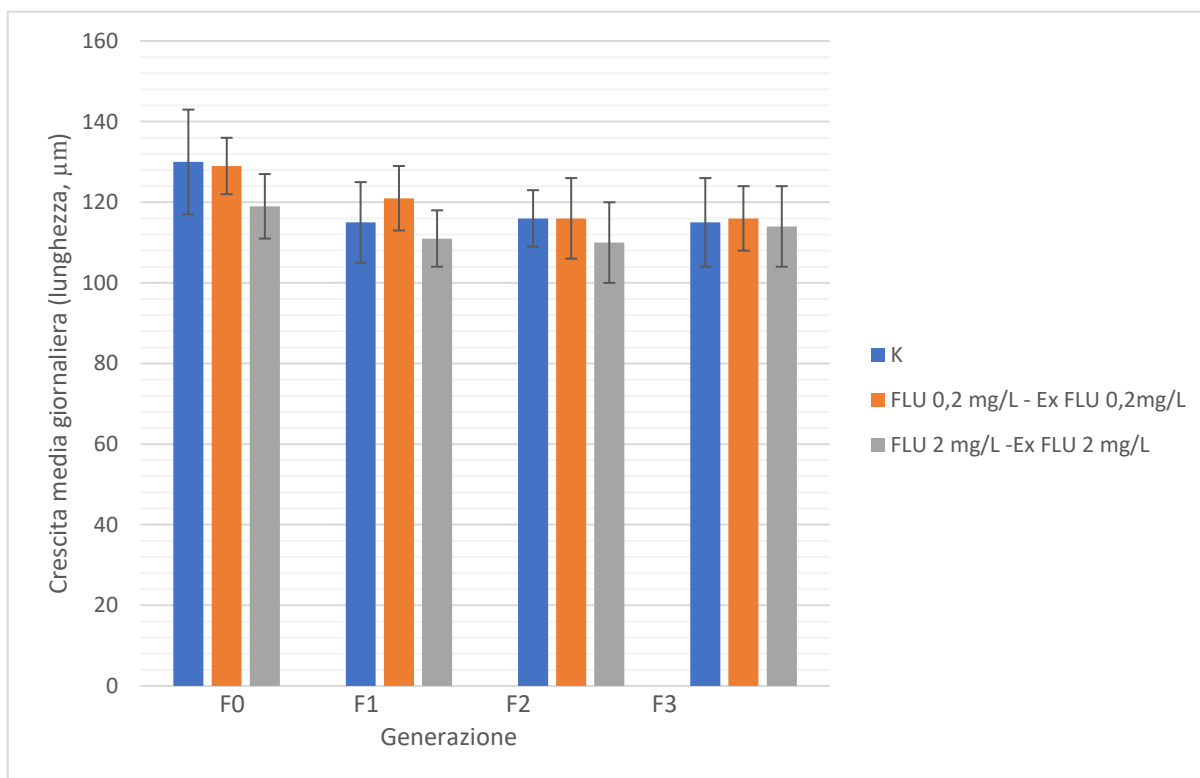


Grafico 9. 1. Confronto della crescita media giornaliera (μm) nei 3 gruppi delle 4 generazioni.

K, controllo; FLU, flumechina.

Anche la mortalità si è rivelata sempre di entità limitata, fatta eccezione per le dafnie F0 esposte a 2 mg/L di flumechina, come mostrato nella tabella 9.1. Va anche osservato che la mortalità nei controlli si è sempre mantenuta ampiamente entro il limite (20%) previsto dal test standard di inibizione della riproduzione (OECD, 2012), a riprova dell'eccellente stato di salute degli esemplari utilizzati nella sperimentazione.

generazione	F0			F1			F2			F3		
Gruppo	K	FLU 0,2 mg/L	FLU 2 mg/L	K	Ex FLU 0,2 mg/L	Ex FLU 2 mg/L	K	Ex FLU 0,2 mg/L	Ex FLU 2 mg/L	K	Ex FLU 0,2 mg/L	Ex FLU 2 mg/L
% mortalità	6%	9%	46%	1%	2%	4%	2%	3%	3%	3%	2%	3%

Tabella 9. 1 Percentuale di mortalità nei vari gruppi delle 4 generazioni oggetto dello studio.

K, controllo; FLU, flumechina.

Relativamente all'efficienza riproduttiva, invece, i risultati ottenuti sono presentati nelle Tabelle 9.2. e 9.3.

Generazione	F0		F1		F2		F3	
Gruppo	K	FLU 2mg/L	K	Ex FLU 2mg/L	K	Ex FLU 2mg/L	K	Ex FLU 2mg/L
Media di neonati prodotti da ciascuna madre (n=100)	42	22*	53	42	56	38	49	41
Media di neonati totali, in occasione dei cambi di medium	352	183	379	300	374	256	308	258
Significatività	p = 0,0005		p = 0,1277		p = 0,1372		p = 0,5300	

Tabella 9.2 Risultati del test t di Student ottenuti dal confronto dei dati relativi alla riproduzione tra i controlli e gli esposti a 2mg/L di FLU e generazioni successive (Ex FLU).

K, controllo; FLU, flumechina.

*p<0,001

Generazione	F0		F1		F2		F3	
Gruppo	K	FLU 0,2 mg/L	K	Ex FLU 0,2 mg/L	K	Ex FLU 0,2 mg/L	K	Ex FLU 0,2 mg/L
Media di neonati prodotti da ciascuna madre (n=100)	42	41	53	53	56	47	49	48
Media del numero di neonati misurato in occasione di ogni cambio di medium	352	342	379	381	374	310	308	303
Significatività	p = 0,7237		p = 0,9464		p = 0,4501		p = 0,9475	

Tabella 9.3 Risultati del test t di Student ottenuti dal confronto dei dati relativi alla riproduzione tra i controlli e gli esposti a 0,2mg/L di FLU e generazioni successive (Ex FLU).

K, controllo; FLU, flumechina.

*p<0,001

I dati relativi alla riproduzione sono stati analizzati anche col test di Kruskal – Wallis seguito dal test di Dunn, confermando quanto ottenuto dal test t di Student.

Come si può vedere dalle tabelle 9.2. e 9.3., solo la generazione F0 esposta a 2mg/L di flumechina presenta una differenza statisticamente significativa (p<0,001) nella riproduzione, rispetto al controllo. Nelle altre generazioni tale differenza, oltre a non essere significativa, si assottiglia progressivamente fino alla generazione F3, dove il tasso di riproduzione è pressoché identico nei vari gruppi. Tale risultato è in disaccordo con dati precedentemente pubblicati, in cui si riscontrava una significativa diminuzione della riproduzione anche nella terza generazione non esposta. Questa variazione potrebbe essere imputata ad una diversa sensibilità alla flumechina, del clone di *D. magna* utilizzato: difatti, per F3 ex 2mg/L la mortalità è stata solo del 3% a fronte del 30% precedentemente riportato (De Liguoro *et al.* 2019). Se però si confronta la mortalità in F0 nei due esperimenti, la differenza si ribalta, con un 46% nel corrente esperimento, a fronte di un 20% nello studio precedente. Pertanto, nel corrente

esperimento potrebbe essersi casualmente realizzata una sorta di selezione in prima generazione, che avrebbe consentito di ottenere generazioni successive più robuste, limitando in tal modo gli effetti tossici in terza generazione.

Va anche osservato che il particolare set-up della sperimentazione, che ha previsto l'utilizzo per ciascun livello di trattamento di 100 dafnie distribuite in 2 vaschette da 50, non ha consentito di calcolare il numero medio di neonati prodotti da ciascuna madre sopravvissuta fino al termine dei 21 giorni, ma solo quello relativo 100 madri originariamente utilizzate nel test. Non era possibile infatti distinguere i neonati prodotti da madri successivamente decedute da quelli prodotti da madri non decedute nel corso del test. Ciò sarebbe stato possibile solo alloggiando singolarmente le 100 dafnie in altrettanti beaker, cosa piuttosto problematica da realizzare. Ad ogni modo, essendo stata la mortalità, dei gruppi exFLU e dei relativi controlli, di entità molto limitata ($\leq 4\%$), si può affermare che anche in presenza dei dati riferiti alle sole madri sopravvissute, l'analisi statistica non avrebbe rivelato alcuna significatività.

In F0, inoltre, le dafnie esposte a 2 mg/L di flumechina hanno manifestato sviluppo disomogeneo e comportamento letargico, con conseguente deposito di alga sul fondo, dovuto ad un ridotto consumo dell'alimento. Lo sviluppo disomogeneo, pur essendo evidente nel corso del test (F0, 2 mg/L), non è stato evidenziato dalle misurazioni realizzate a fine test; ciò in quanto tali misurazioni riguardavano, ovviamente, solo i soggetti sopravvissuti, mentre i soggetti con evidente deficit dello sviluppo erano tutti già deceduti nel corso del test. Va notato pure che il comportamento letargico ha continuato ad essere presente fino alla generazione F2 lungo la linea ex FLU 2mg/L, anche se con minore intensità e frequenza. Considerata la capacità di tale classe di farmaci di interagire con i recettori del sistema nervoso alterandone la funzionalità (Chilin, 2017), il comportamento letargico è imputabile alla presenza di flumechina nel medium di allevamento di F0 e all'esposizione a tale sostanza durante le prime fasi dello sviluppo di F1; tuttavia, tali motivazioni sono da escludere per quanto riguarda la letargia osservata in F2. In tal caso, l'alterazione potrebbe essere conseguenza di alterazioni epigenetiche, che eventualmente verranno messe in luce dalle analisi biomolecolari che sono in corso. Oppure potrebbe essere la conseguenza di un accumulo di flumechina negli embrioni della generazione F1 e successivo trasferimento alle

uova prodotte dagli adulti F1 e quindi agli embrioni F2: è stata infatti evidenziata da alcuni studi la capacità dei chinoloni di dare fenomeni di bioaccumulo nei pesci (Zhao *et al.*, 2015; Ghao *et al.*, 2012). Un altro effetto rilevato con frequenza irregolare in F1 e F2 è stato quello della scarsa responsività dei neonati alla luce. Per agevolare la raccolta dei neonati quando se ne effettua il conteggio, si utilizza infatti una fonte luminosa, in modo da attrarli in una zona precisa della vaschetta, sfruttando il fenomeno della fototassi (Dojmi Di Delupis, 1997). È stato pertanto possibile osservare la scarsa tendenza ad essere attratti dalla luce che, occasionalmente, i neonati F1 e F2 palesavano. Danni alla vista causati dall'assunzione di fluorochinoloni sono stati osservati nel gatto, a causa dell'accumulo nell'occhio di queste sostanze che, essendo fotoreattive, generano specie reattive dell'ossigeno che danneggiano gravemente la retina (Ramirez *et al.*, 2011). Effetti simili sono stati osservati nel coniglio (Kumbahar *et al.*, 2014; Rampal *et al.*, 2008) e nell'uomo, seppur con un'incidenza inferiore (Etminan *et al.*, 2012). È quindi plausibile che un simile danno sia stato procurato alla retina dei dafnidi con un meccanismo analogo. Come discusso in precedenza, se ciò può essere causato all'esposizione diretta a flumechina nelle prime fasi della vita dei soggetti appartenenti a F1, per quelli di F2 sarebbe necessariamente dovuto ad un trasferimento della flumechina tra le due generazioni.

10 CONCLUSIONI

I test ufficiali (acuto e cronico) di ecotossicità su *D. magna* hanno mostrato di avere delle limitazioni quando si saggiavano farmaci come i fluorochinoloni, in grado di esprimere una tossicità acuta ritardata (Tolosi & De Liguoro, 2021) ed una tossicità cronica multigenerazionale e/o transgenerazionale (Dalla Bona *et al.*, 2016; De Liguoro *et al.*, 2019). In entrambi i test, i parametri di tossicità di questi farmaci (EC₅₀ e NOEC, rispettivamente) vengono sovrastimati, con conseguente sottostima del rischio ambientale. I meccanismi molecolari che stanno alla base delle succitate forme di tossicità espresse da questa classe di composti, potrebbero dipendere dalla loro intrinseca capacità di interagire con enzimi che regolano il DNA.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la tossicità multigenerazionale e/o transgenerazionale di flumechina su *D. magna*, considerando come endpoint la letalità, lo sviluppo, la numerosità della prole, ed eventuali altri effetti subletali. Il particolare design sperimentale, con gruppi da 100 esemplari ciascuno, ha consentito di raccogliere a termine delle generazioni F0, F2 ed F3, esemplari in quantità sufficiente da poter essere sottoposti ad estrazione di DNA ed RNA, per successive valutazioni di tossicità a livello molecolare. Le performance ottimali dei gruppi di controllo (crescita, sopravvivenza, capacità riproduttiva) lungo l'arco delle 4 generazioni oggetto di studio, hanno testimoniato la particolare adeguatezza delle condizioni di coltura ed hanno contribuito ad accrescere il potere statistico del saggio.

I risultati fin qui ottenuti, con i gruppi ex-FLU che rispondono in F3 in modo sovrapponibile al gruppo di controllo, parrebbero non evidenziare alcuna tossicità transgenerazionale. Tuttavia, questo rilievo è in disaccordo con quanto osservato in studi precedenti, dove l'incidenza degli effetti della flumechina sulla prolificità e sulla sopravvivenza dei soggetti si manifestava in modo significativo anche in F3, in seguito ad esposizione al farmaco della sola generazione F0 (De Liguoro *et al.*, 2019). Ad ogni modo, ciò non esclude che dalle analisi molecolari in corso di svolgimento possano emergere alterazioni genetiche, epigenetiche o dell'espressione dei geni che, pur non avendo causato ripercussioni evidenti a livello fenotipico, testimonierebbero la capacità della flumechina di interferire con l'omeostasi degli acidi nucleici dell'organismo eucariote. Inoltre, non va trascurato il fatto che in F1 ed F2 sono state registrate, nei gruppi

ex-FLU, delle alterazioni del fenotipo (diminuzione della fototassi e comportamento letargico) che testimoniano quantomeno una tossicità multigenerazionale. Questa potrebbe essere semplicemente dovuta all'esposizione prenatale, dei dafnidi generati da F0, e delle loro cellule germinali, rispettivamente per F1, e per F2. Peraltro, pure in questo caso non si può escludere che quella osservata sia una tossicità su base transgenerazionale, e ci si augura che gli approfondimenti biomolecolari possano chiarire anche questo aspetto.

Bibliografia

- Abdel-Aal, M. A. A., Abdel-Aziz, S. A., Shaykoon, M. S. A. & Abuo-Rahma, G. E. A., 2019. *Towards anticancer fluoroquinolones: A review article*. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft.
- Williams, A. J.; Deck, J.; Freeman, J. P.; Chiarelli, M. P.; Adjei, M. D.; Heinze, T. M.; Sutherland, J. B., 2007. *Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans**. Chemosphere.
- APAT, 2006. *L'ecotossicologia negli ambienti acquatici*.
- Badal, S.; Her, Y. F.; Maher III, L. J., 2015. *Nonantibiotic Effects of Fluoroquinolones in Mammalian Cells*. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 290(36), pp. 22287-22297.
- Boxall, A. B., 2004. *The environmental side effects of medication*.
- Carlone, N.; Pompei, R., 2013. *MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA - II EDIZIONE*. Napoli: EdiSES.
- Cascone, A., Forni, C.; Migliore, L., 2004. *FLUMEQUINE UPTAKE AND THE AQUATIC DUCKWEED, LEMNA MINOR L.*. Water, Air, and Soil Pollution, Volume 156, p. 241–249.
- Dalla Bona, M.; Lizzi, F.; Borgato, A.; De Liguoro, M., 2016. *Increasing toxicity of enrofloxacin over four generations of *Daphnia magna**. Ecotoxicology and Environmental Safety, Issue 132, pp. 397 - 402.
- De Liguoro, M.; Maraj, S.; Merlanti, R., 2019. *Transgenerational toxicity of flumequine over four generations of *Daphnia magna**. Ecotoxicology and Environmental Safety, Issue 169, pp. 814 - 821.
- Dojmi Di Delupis, G., 1997. *Saggi di ecotossicità con *Daphnia magna* basati sul comportamento fototattico*. Istituto Superiore di Sanità.
- EMA, 2019. *Disabling and potentially permanent side effects lead to suspension or restrictions of quinolone and fluoroquinolone antibiotics*.
- Etminan, M.; Forooghian, F.; Brophy, J. M.; Bird, S. T.; Maberley, D., 2012. *Oral Fluoroquinolones and the Risk of Retinal Detachment*. JAMA, 307(13), pp. 1414-1419.
- FDA, 2017. *Fluoroquinolone Safety Labeling Changes*.
- Gasco, A.; Gualtieri, F.; Melchiorre, C., 2020. *Chimica farmaceutica*. Seconda edizione a cura di Casa editrice ambrosiana.

- Ghao, L.; Shi, Y.; Li, W.; Liu, J.; Cai, Y., 2012. *Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China*. Journal of Environmental Monitoring, Issue 14, pp. 1247-1254.
- Hektoen, H.; Berge, J. A.; Hormazabal, V.; Yndestad, M., 1995. *Persistence of antibacterial agents in marine sediments*. Aquaculture, Volume 133, pp. 175-184.
- Janecko, N.; Pokludova, L.; Blahova, J.; Svobodova, Z.; Literak, I., 2016. *IMPLICATIONS OF FLUOROQUINOLONE CONTAMINATION FOR THE AQUATIC ENVIROMENT - A REVIEW*. Environmental Toxicology and Chemistry, 35(11), p. 2647–2656.
- Kendall, R. J.; Anderson, T. A.; Baker, R. J.; Bens, C. M.; Carr, J. A.; Chiodo, L., 2001. *ECOTOXICOLOGY*. USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications.
- Kumbahar, G.; Khan, A.; Rampal, S., 2014. Evaluation of gatifloxacin for its potential to induce antioxidant imbalance and retinopathy in rabbits. *Human and Experimental Toxicology*, 4(34), pp. 372-379.
- Lai, H.-T.; Lin, J.-J., 2009. Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters. *Chemosphere*, pp. 462-468.
- Lalumera, G. M.; Calamari, D.; Galii, P.; Castiglioni, S.; Crosa, G.; Fanelli, R., 2003. *Preliminary investigation on the enviromental occurrence and effects on antibiotics used in aquaculture in Italy*. Chemosphere.
- Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W., 2014. *Foye's principi di chimica farmaceutica*. Piccin.
- Lutzhøft, H.-C. H.; Halling-Sørensen, B.; Jørgensen, S. E., 1999. *Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 36, p. 1–6.
- McGee, E. U.; Samuel, E.; Boronea, B.; Dillard, N.; Milby, M. N.; Lewis, S. J., 2019. *Quinolone Allergy*. MDPI Pharmacy.
- Michalak, K.; Sobolewska-Włodarczyk, A.; Włodarczyk, M.; Sobolewska, J.; Woźniak, P.; Sobolewski, B., 2017. *Treatment of the Fluoroquinolone-Associated Disability: The Pathobiochemical Implications*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Migliore, L.; Cozzolino, S.; Fiori, M., 2000. *Phytotoxicity to and uptake of flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, Lythrum salicaria L.* Chemosphere, Volume 40, pp. 741-750.

Ministero della Salute, 2021. *Banca dati dei Medicinali Veterinari*. [Online]
Available at: <https://www.salute.gov.it/farmacivetWeb/FarmacivetServlet>

OECD, 2004. *Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test*. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2006. *Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 221: Lemna sp., Growth Inhibition Test*. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2012. *Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: Daphnia magna Reproduction Test*. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

Patrick, G. L., 2020. *Chimica Farmaceutica*. Napoli: EdiSES.

Pouliquen, H.; Delépée, R.; Larhantec-Verdier, M.; Morvan, M.-L.; Le Bris, H., 2007. *Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions*. Aquaculture, Issue 262, pp. 23 - 28.

Ramirez, C. J.; Minch, J. D.; Gay, J. M.; Lahmers, S. M.; Guerra, D. J.; Haldorson, G. J.; Schneider, T.; Mealey, K. L., 2011. *Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats*. Pharmacogenetics and Genomics, Issue 21, pp. 66-75.

Rampal, S.; Kaur, R.; Sethi, R.; Singh, O.; Sood, N., 2008. *Ofloxacin-associated retinopathy in rabbits: role of oxidative stress*. Human and Experimental Toxicology, 5(27), pp. 409-415.

Robinson, A. A.; Belden, J. B.; Lydy, M. J., 2005. *TOXICITY OF FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS TO AQUATIC ORGANISMS*. Environmental Toxicology and Chemistry, 24(2), p. 423-430.

Rodrigues-Silva; Caio, e. a., 2013. *Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity*. Chemical engineering journal 224, pp. 46-54.

Russo, F., 2008. *Sviluppo di metodiche per la caratterizzazione ecotossicologica di miscele di farmaci: protocolli sperimentali*. Università degli Studi di Napoli Federico II.

Sanci, A.; Rosa, S., 1997. *Bioassay for aquatic ecosystems review and classification; Rassegna dei principali test di ecotossicologia acquatica*. Italy: ENEA - dipartimento ambiente.

- Smirnov, N. N., 2014. *Physiology of the Cladocera*. Elsevier, Amsterdam.
- Sorensen, B. H.; Nielsen S.N.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Lutzhoft, H.C. Holten; Jorgensen, S.E, 1997. *Occurrence, Fate and effects of Pharmaceutical Substances in the Enviroment - A Review*; Elsevier Science Ltd.
- Tolosi, R.; De Liguoro, M., 2021. *Delayed toxicity of three fluoroquinolones and their mixtures after neonatal or embryonic exposure, in Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Issue 225.
- Turner, J., 2011. *Antibiotics in animal farming public health and animal welfare; Compassion in wordl farming*.
- Wall, M. K.; Mitchenall, L. A.; Maxwell, A., 2004. *Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria*. *PNAS*.
- Zhao, J.-L.; Liu, Y.-S.; Jiang, Y.-X.; Su, H.-C.; Zhang, Q.-Q.; Cheng, X.-W.; Yang, Y.-Y.; Chen, J.; Liu, S.-S.; Pan, C.-G.; Huang, G-Y.; Ying, G.-G., 2015. *Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a higly urbanized region*. *Enviromental Pollution*, Issue 198, pp. 15-24.
- Zounková, R.; Klimesová, Z.; Nepejchalová, L.; Hilscherová, K.; Blàha, L., 2011. *Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquacolture*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Volume 30, p. 1184–1189.

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il professor Marco De Liguoro per avermi permesso di prendere parte a questo interessante studio e per il grande supporto fornitomi durante la stesura di questa tesi.

Ringrazio anche Roberta Tolosi per i suoi preziosi consigli ma, soprattutto, per avermi minuziosamente istruita e pazientemente seguita durante tutta l'attività di laboratorio.

Ringrazio infine tutta la mia famiglia e i miei amici per essermi stati accanto in questo periodo.