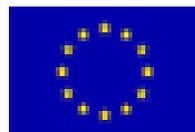


Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE**

**XXII CICLO 2006-2009**

*Studi su trasformazioni chimiche di  
xenobiotici in sistemi modello di impianti di  
trattamento di acque reflue*

Candidata  
Dott.<sup>ssa</sup> Paola Pistillo

Tutore  
Prof. Lucio Previtiera

Relatore  
Prof.<sup>ssa</sup> Alessandra Napolitano

Coordinatore: Prof. Aldo Vitagliano

# Indice

1. Introduzione	1
1.1 Farmaci nell'ambiente ed ecotossicità	4
Normative	10
1.2 Impianto di trattamento delle acque reflue ( <i>STP</i> )	14
2. Farmaci studiati	23
2.1 Atenololo	23
2.2 Ranitidina	31
2.3 Naprossene	41
2.4 Fibrati	45
2.5 Lincomicina	49
2.6 Tamoxifen	54
2.7 Sildenafil	57
2.8 Tadalafil	67
3. Test tossicologici	74
4. Conclusioni	89
5. Parte sperimentale	94
6. Procedure test di tossicità	117
7. Bibliografia	128
8. Abstract	141
Elenco pubblicazioni	153

## **1. Introduzione**

Si può definire “inquinante” una qualunque sostanza, di origine naturale o antropica, la cui introduzione nell’ambiente, direttamente o indirettamente, comporti un pericolo per la salute dell’uomo e danneggi le risorse viventi e il sistema ecologico, compromettendone le potenzialità di riutilizzo da parte dell’uomo stesso. Per “inquinamento” quindi s’intende l’alterazione dell’ambiente che produce disagi o danni permanenti agli equilibri di un ecosistema attraverso l’immissione, nei vari comparti biologici, di suddette sostanze.

Negli anni '70, nell’ambito della Conferenza delle Nazioni Unite sull’Ambiente Umano, emerge la consapevolezza che le risorse naturali della Terra devono essere tutelate attraverso pianificazioni strategiche e che la natura ha un ruolo fondamentale nell’economia (Stoccolma, 1972). Per la prima volta in sede internazionale sono affrontati i problemi connessi all’esaurimento delle risorse naturali e all’inquinamento dell’ambiente.

L’interesse a preservare l’ambiente conduce la comunità scientifica a rivolgere la propria attenzione all’influenza che gli inquinanti possono avere sulla salute umana e sugli equilibri degli ecosistemi.

Inizialmente la maggiore attenzione del settore scientifico si è rivolta a contaminanti quali i metalli e alcuni composti organici di origine antropica. Fra i metalli con azione tossica sono annoverati i metalli pesanti (piombo, cadmio, mercurio, cromo, manganese), ma in

generale, con effetto tossico naturalmente commisurato alle quantità, effetti variamente nocivi possono essere indotti dall'assorbimento in varie forme di moltissimi altri (alluminio, stagno, tallio, bismuto, arsenico, rame, oro, zinco).

Le prime sostanze organiche prese in considerazione in quanto altamente pericolose per l'ambiente e per la salute umana, sono stati i composti organoclorurati quali i policlorobifenili, le diossine e i pesticidi, come il DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano). La pericolosità di queste sostanze è principalmente imputabile alla loro elevata persistenza ambientale. La difficoltà di eliminarli nasce dalle stesse caratteristiche che, in linea teorica, dovevano rendere tali sostanze più efficienti nei confronti degli organismi target, lipofilicità e stabilità.

Ad esempio il DDT, originariamente progettato e prodotto come potente antiparassitario, fu usato per combattere la zanzara anofele, responsabile della diffusione della malaria, poiché si credeva che seppure tossico per gli insetti non avesse nessun effetto sull'uomo. Esso e i suoi metaboliti sono molto resistenti nell'ambiente e si accumulano lungo la catena alimentare, il che comporta che i predatori sono maggiormente esposti ai danni da DDT rispetto ad altri animali dello stesso ambiente che si trovano più in basso nella piramide alimentare.

I policlorobifenili (PCB) sono sostanze ampiamente impiegate in campo industriale come dielettrici per condensatori e trasformatori, fluidi per scambio termico, lubrificanti, oltre che additivi in vernici, pesticidi, carte copiative, adesivi, sigillanti, ritardanti di fiamma.

Anche i PCB sono caratterizzati da un'elevata lipofilicità e stabilità e come per il DDT, il cui uso fu vietato in Italia nel 1978, anche l'utilizzo dei PCB è stato soggetto a limitazioni all'inizio degli anni '70 fino al 1983, anno in cui in Italia ne è stata vietata la produzione.

Il continuo miglioramento della sensibilità e dell'accuratezza delle tecniche analitiche ha permesso alla comunità scientifica di individuare sempre più sostanze nell'ambiente, specialmente negli ecosistemi acquatici, e negli anni più recenti ha assunto un ruolo rilevante, una classe di sostanze di uso comune e quotidiano, definite *Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs*. Con tale termine ci si riferisce in generale ai principi attivi dei prodotti usati per la cura della persona, sia di tipo estetico, profumi e cosmetici ad esempio, sia per la salute personale. Il termine *PPCPs* include inoltre prodotti usati in campo agro-alimentare per favorire la crescita e/o la salute del bestiame. Essi quindi comprendono una variegata collezione di migliaia di sostanze chimiche tra cui in particolare i farmaci. Il continuo e sempre più massiccio utilizzo dei *PPCPs* giustifica il loro ritrovamento in diversi comparti acquatici e li classifica allo stato attuale come una delle principali fonti di molecole bioattive in tali ambienti (Heberer et al., 2002; Zuccato et al., 2005).

Escludendo i farmaci di uso veterinario, nell'Unione Europea (UE) esistono circa 3000 diverse sostanze utilizzate in medicina umana. In Italia è stimata una commercializzazione complessiva di principi attivi farmacologici per il solo utilizzo umano in ragione di migliaia di tonnellate l'anno, mentre per l'impiego animale, che spesso sfugge ai canali ufficiali, le quantità sono meno calcolabili ma considerate

comparabili. I farmaci costituiscono un ampio e vario gruppo di composti utilizzati per la diagnosi, la cura, il trattamento o la prevenzione di malattie. Sono molecole progettate per indurre un effetto fisiologico utile all'organismo. Essi sono concepiti per essere attivi a bassissime concentrazioni, attraversare le membrane biologiche e presentare tempi di persistenza nell'organismo, sufficienti all'espletamento del loro effetto terapeutico prima di essere escreti attraverso le urine e le feci (Bottoni e Fidente, 2005). Malgrado queste proprietà siano certamente utili a livello terapeutico, esse possono portare alla fine a un consistente impatto ambientale e a serie ripercussioni sulla salute umana.

### **1.1 Farmaci nell'ambiente ed ecotossicità**

Le fonti d'immissione dei farmaci nell'ambiente sono molteplici: lo smaltimento in discarica dei farmaci inutilizzati e scaduti, lo smaltimento dei liquami domestici, ospedalieri, industriali, e quelli derivanti da impianti di acquacoltura e di allevamenti zootecnici.

Altre fonti di contaminazione di tipo indiretto derivano dal riutilizzo, per scopi irrigui e per la fertilizzazione dei suoli, dei reflui derivanti dagli impianti di depurazione.

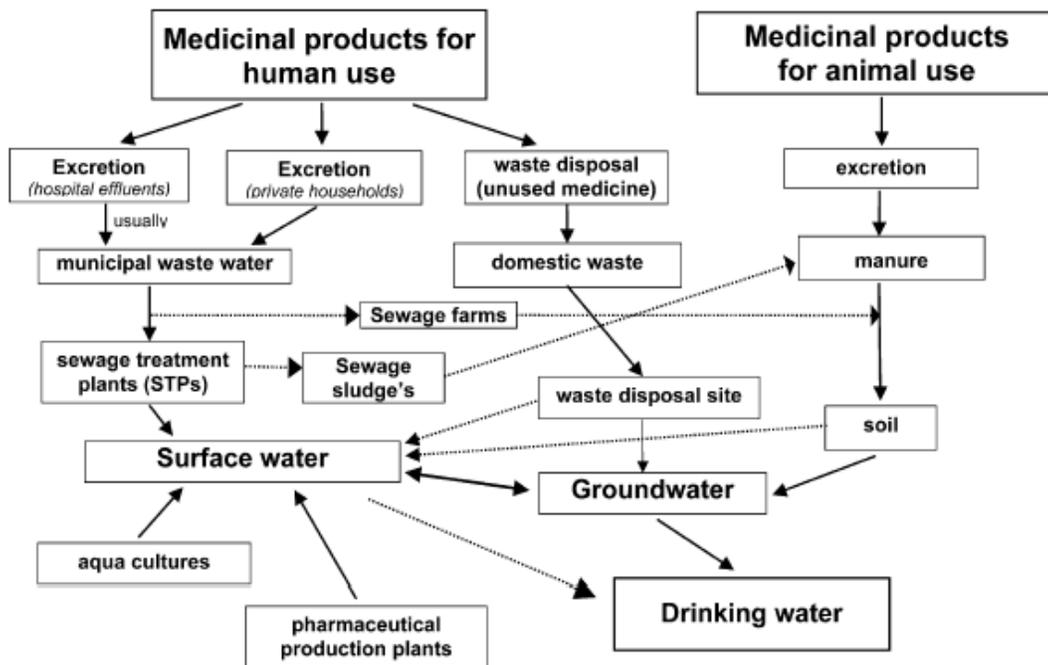


Figura 1. Possibili fonti d'immissione dei farmaci nell'ambiente acquatico

Sicuramente la principale via d'immissione nell'ambiente dei farmaci è l'ammalato (Zuccato et al., 2000; Kümmeler, 2001). È stato calcolato che più del 70-80% dell'inquinamento da farmaci ha tale origine, mentre tutte le altre fonti, contribuiscono per il restante 20-30%.

Assunti dall'organismo, i principi attivi dei farmaci sono soggetti a trasformazioni chimiche, principalmente ad opera di enzimi, attraverso le quali sono metabolizzati.

Una percentuale variabile del composto di partenza resta comunque inalterata ed è escreta attraverso le urine o le feci, assieme a miscele di

metaboliti attivi, dotati cioè di attività farmacologica simile a quella del farmaco parentale, o coniugati, che sono generalmente meno attivi del composto parentale o addirittura privi di attività. La porzione di farmaco non soggetta a trasformazione è definita “non utile” poiché eliminata dall’organismo senza aver subito alcuna modificazione metabolica e quindi senza aver svolto la propria funzione (Reddersen et al., 2002). Di conseguenza, una grande quantità di principi attivi farmacologici, all’interno delle acque fognarie, raggiunge gli impianti di depurazione delle acque reflue *STP* (*Sewage Treatment Plants*).

In molti casi gli impianti *STP*, deputati ad accogliere gli scarichi domestici, non sono in grado di eliminare completamente composti di questo tipo. Il refluo è sottoposto a varie fasi di depurazione: inizialmente sono applicati dei trattamenti detti primari volti alla rimozione del materiale solido sospeso, poi il refluo subisce un trattamento di tipo biologico, noto come fango attivo, che dovrebbe consentire la mineralizzazione del materiale organico in esso presente, infine è sottoposto a una fase finale di sterilizzazione che ha come scopo principale quello di ridurre la concentrazione degli agenti patogeni presenti al di sotto dei valori limite imposti dalle normative vigenti nelle varie Nazioni (Liberti e Notarnicola, 1999) prima di scaricare il refluo nelle acque riceventi o reintrodurlo in cicli per il suo riutilizzo.

Se i processi di trattamento applicati al refluo non inducono la mineralizzazione degli xenobiotici presenti, essi possono raggiungere le acque superficiali (Heberer et al., 2002). La presenza di prodotti farmaceutici in acque superficiali e di falda è stata discussa per la

prima volta negli anni '80 (Richardson e Bowron, 1985) ma l'accento su di essa è stato posto nella seconda metà degli anni '90 (Ternes, 1998; Hirsch et al., 1999; Stumpf et al. 1999). Numerosi sono allo stato attuale i libri e le riviste che hanno come oggetto di discussione l'argomento noto come "*Pharmaceuticals in the environment*" (Daughton e Ternes, 1999; Heberer, 2002a; Kümmerer, 2004). Esistono inoltre molti lavori che evidenziano la presenza di farmaci in acqua potabile (Zuccato et al., 2000; Heberer, 2002b).

Il comportamento e il destino dei prodotti farmaceutici e dei loro metaboliti biologici nel comparto acquatico non sono sufficientemente noti. La bassa volatilità dei farmaci indica che la distribuzione nell'ambiente avviene principalmente attraverso il trasporto in acqua. La natura polare di queste sostanze ne impedisce la fuga dal regno acquatico facilitandone la dispersione lungo la catena alimentare (Daughton e Ternes, 1999).

Una volta nell'ambiente, il farmaco, in base alle sue caratteristiche chimico-fisiche può essere degradato oppure persistere a lungo (Halling-Sørensen et al. 1998; Andreozzi et al., 2003; Calamari et al., 2003).

Alcuni tra i farmaci più noti e diffusi come l'eritromicina, il naprossene o il sulfametossazolo, hanno un'emivita nell'ambiente superiore a un anno. Questi farmaci sono definiti "pseudo persistenti", poiché anche se relativamente degradabili, essi possono accumularsi fino a raggiungere concentrazioni biologicamente attive. L'acido clofibrico, principale metabolita attivo del clofibrato, è considerato invece un inquinante persistente. La sua persistenza ambientale è di

ventuno anni e ancora si ritrova in fiumi e laghi di paesi ove non è più in uso da anni (Zuccato et *al.*, 2000).

Le concentrazioni ambientali dei farmaci sono nel range dei ng/L - µg/L e sebbene tali valori non siano capaci di esercitare effetti tossici acuti sull'uomo e sugli altri organismi viventi, tuttavia non deve essere sottovalutato il rischio connesso a un'esposizione continua. Infatti, gli effetti tossici dipendono da diversi fattori: dose, durata dell'esposizione, via di somministrazione, caratteristiche dell'organismo esposto (Fent et *al.*, 2006; Jjemba, 2006).

Queste sostanze sono quindi potenzialmente in grado di contaminare l'ambiente per fenomeni di accumulo locale e bioaccumulo in specie vegetali e animali dell'ambiente acquatico (Coogan et *al.*, 2006) e, per biomagnificazione lungo la catena trofica, possono raggiungere gli animali superiori e l'uomo (Gray, 2002).

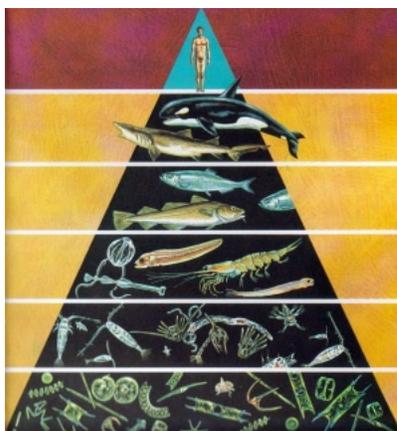


Figura 2. Piramide catena alimentare acquatica

Oltre al consumo di organismi acquatici venuti in contatto con acque inquinate anche l'uso di prodotti agricoli trattati con esse, espone l'uomo agli effetti dovuti alla presenza di farmaci.

Molti dati sono ancora limitati a studi su animali superiori: farmaci con effetti sul sistema endocrino possono portare ad alterazione dei livelli ormonali con sviluppo di caratteri sessuali secondari nei pesci (Larsson et al., 1999) e alterazioni nella riproduzione di pesci e molluschi (Jobling et al., 2004); gli antibiotici sono invece in grado di indurre resistenza nei ceppi batterici costituendo una grave minaccia per la salute umana e animale (Hirsch et al., 1999; Kümmerer, 2004); i farmaci antitumorali, come il tamoxifen, rilevato sia negli effluenti degli *STP* sia in acque superficiali (Hilton e Thomas, 2003; Ashton et al., 2004) possono avere effetti tossici (Della Greca et al., 2007).

Poiché i farmaci sono solitamente presenti nell'ambiente come miscele complesse, per un'attenta valutazione degli effetti è necessario valutare la tossicità delle miscele. Recenti studi scientifici hanno mostrato che miscele di farmaci alle concentrazioni effettivamente ritrovate nell'ambiente acquatico sono in grado di esercitare rilevanti effetti tossici sulla crescita di cellule embrionali umane (Pomati et al., 2006) e possono mostrare effetti tossici significativamente superiori a quelli esercitati dai singoli farmaci (Cleuvers, 2003).

Un aspetto non molto studiato riguarda le possibili trasformazioni che i farmaci possono subire per processi biotici e abiotici, dalla loro immissione nelle acque reflue fino alla loro captazione per usi irrigui e domestici.

Per trasformazioni biotiche s'intendono le modificazioni strutturali in cui è coinvolto il farmaco come substrato metabolico. Tale tipo di trasformazione può essere indotta dai microrganismi usati nel processo di rimozione biologica adoperato nella depurazione dei reflui negli impianti *STP* (fango attivo) o ad opera di organismi acquatici presenti nelle acque superficiali riceventi. Per trasformazioni abiotiche s'intende sia i processi idrolitici e fotochimici che possono avvenire in natura, sia i processi indotti dai trattamenti chimici di disinfezione cui è sottoposto il refluo negli *STP*. Questi processi portano alla formazione di sostanze chimicamente differenti dal farmaco di origine, denominate metaboliti ambientali.

## **Normative**

La linea guida EU 92/18 EWG per i prodotti farmaceutici veterinari è stata la prima a proporre test ecotossicologici come parte delle procedure di registrazione di farmaci, ed è in vigore come legge in alcuni paesi Europei sin dal 1995. Le applicazioni per la registrazione di un farmaco devono includere una valutazione dei rischi potenziali per l'ambiente posti dal nuovo prodotto (CEC III/5944/94).

La normativa prevede per tutti i nuovi farmaci che, prima di essere messi in commercio all'interno dell'UE, ne sia eseguita la valutazione del rischio ambientale (*Environmental Risk Assessment*, ERA). Le linee-guida per compiere tale valutazione sono state preparate

dall'EMEA (*European Medicinal Evaluation Agency*) e prevedono una valutazione multistadio che termina quando è dimostrata la non pericolosità ambientale del farmaco. Se i risultati della valutazione non possono invece escludere la possibilità di un rischio per l'ambiente, l'autorizzazione è condizionata all'adozione di una serie di misure di precauzione e sicurezza, mirate a mitigare, nei limiti del possibile, l'esposizione dell'ambiente al nuovo farmaco.

In particolare sono richieste etichettature speciali, con l'indicazione dei potenziali rischi ambientali che dovranno essere descritti in etichetta e nel foglietto illustrativo del prodotto medicinale, con l'indicazione delle precauzioni cui attenersi per lo stoccaggio e la somministrazione ai pazienti.

Le linee-guida dell'EMEA regolano il rischio ambientale riguardo ai nuovi farmaci ma in nessun caso un prodotto riconosciuto pericoloso per l'ambiente è eliminato. Inoltre, per ora, nulla è previsto per i farmaci già in commercio. I procedimenti attraverso cui tale valutazione avviene sono stati definiti, nel 1997, dal comitato per i prodotti medicinali veterinari (CVMP) e, nel 2003, dal comitato per i prodotti medicinali per uso umano. Questi comitati hanno emanato tali linee guida EMEA 1997 ed EMEA 2003, nelle quali è previsto per ciascun farmaco, il calcolo della PEC (predicted environmental concentration) e della PNEC (predicted no effect concentration). Un ingrediente farmaceutico è considerato ambientalmente compatibile se il valore di PNEC è più elevato del PEC. Il valore di PEC tiene conto delle quantità inizialmente immesse nell'ambiente, della distribuzione, dei metodi e delle velocità di degradazione del farmaco nell'ambiente.

Per la valutazione della PNEC sono previsti test di tossicità su organismi acquatici come alghe, molluschi, pesci, applicando opportuni fattori di correzione ai test di tossicità acuta e cronica.

Il quoziente di rischio definito dal rapporto tra PEC/PNEC deve quindi essere  $<1$ .

Negli USA l'*Environmental Protection Agency* (EPA) rivolge una notevole considerazione ai progetti che riguardano il ritrovamento, il trasporto e il destino di sostanze farmaceutiche e altri contaminanti emergenti nelle acque reflue, così come agli studi tossicologici relazionati e ai test sull'efficienza degli impianti *STP* nell'eliminare questi composti (*Strategic plan, clean and safe water*, EPA 2006-2011).

La compilazione di un ERA per sostanze farmaceutiche presenta numerose difficoltà: l'enorme diversificazione degli agenti farmaceutici utilizzati sia per impiego veterinario sia per uso umano, le quantità in uso di tali sostanze in base alle dosi e alla durata del trattamento, le differenti vie d'immissione, per le quali è di grande importanza valutare la solubilità in acqua e la capacità delle sostanze stesse di aggregarsi a solidi in modo da prevedere in quale settore ambientale sia da ricercarsi un eventuale accumulo. Un'altra difficoltà nasce dalla necessità di ricercare non solo i farmaci tal quali ma anche i possibili derivati generatisi in seguito alle trasformazioni metaboliche che avvengono all'interno dell'organismo.

Per eseguire uno screening valido è necessaria un'attenta procedura di campionamento, seguita dalla misurazione delle concentrazioni dei

farmaci e dei loro metaboliti in matrici complesse, ottenibile solo con l'impiego di tecniche analitiche di grande precisione e accuratezza.

La valutazione del destino ambientale dei prodotti farmaceutici e dei loro effetti su specie acquatiche in realtà è ulteriormente complicata dalla loro capacità di essere degradati in natura.

Come descritto in precedenza, la degradazione avviene in seguito a trasformazioni che sono generalmente distinte in biotiche e abiotiche, il cui risultato può tanto essere la completa degradazione del farmaco quanto la generazione di metaboliti ambientali. Tali metaboliti ambientali possono a loro volta comportare le stesse problematiche dei composti di partenza e sono altrettanto importanti in previsione della compilazione di un ERA. Esistono tuttavia opinioni contrastanti circa gli studi di tossicità per i metaboliti ambientali. Mentre L'EMEA stabilisce test basati su PEC e PNEC per prodotti formati in quantità superiori al 10% rispetto al farmaco parentale, l'*European Scientific Committee of Toxicity, Ecotoxicity and Environment* ritiene inappropriato scegliere i metaboliti da studiare in base alla percentuale di formazione (CSTEE, 2001), ammettendo la possibilità che un composto possa essere significativamente più nocivo di altri anche se in quantità molto minori. Tale prospettiva poggia le basi su alcuni studi riportati in letteratura. Ad esempio, una ricerca condotta sulla tossicità di prednisolone, dexametasone e loro prodotti in seguito a degradazione fotochimica, ha evidenziato per uno dei fotoderivati una tossicità cronica cento volte superiore a quella del prednisolone stesso (Della Greca et al., 2004b).

## **1.2 Impianto di trattamento delle acque reflue (STP)**

Esistono studi riguardanti le percentuali di abbattimento dei farmaci durante i processi di trattamento dei reflui. Tali studi si basano sulla misurazione delle concentrazioni a monte e a valle degli impianti di depurazione e evidenziano che, in base alla tecnologia di trattamento, al tempo di ritenzione dei liquami negli impianti, alla stagione e ad altri fattori, come ad esempio le proprietà chimico-fisiche del farmaco, l'entità dell'abbattimento è variabile (Ternes, 1998; Carballa et al., 2004). Confrontando la concentrazione di un farmaco misurata a monte degli impianti con la sua concentrazione a valle, si può notare che negli effluenti possono aversi concentrazioni minori di quelle d'entrata.

Questo dimostra che parte del farmaco, durante le varie fasi del trattamento di depurazione applicato al refluo, ha reagito. Esso può essere stato degradato o essersi trasformato chimicamente. Se infatti il farmaco supera il processo di mineralizzazione biologica può essere coinvolto in reazioni chimiche, durante le fasi di sterilizzazione ad opera di agenti chimici o a processi di trasformazione fotochimica durante la sterilizzazione ad opera di agenti fisici (UV). Per una valutazione effettiva del rischio connesso all'inquinamento da farmaci, bisogna quindi tener presente che nelle acque scaricate dagli impianti di depurazioni, potrebbero essere presenti dei prodotti di trasformazione del farmaco parentale. Particolarmente scarsa è ancora allo stato attuale, l'attenzione della comunità scientifica a

quest'aspetto. Scarse, infatti, sono le informazioni sull'identificazione, sulla persistenza ambientale e sull'ecotossicità dei prodotti che derivano dai processi di disinfezione.

Le acque di scarico introdotte negli impianti subiscono differenti fasi di trattamento prima di essere scaricate nelle acque riceventi o essere introdotte in cicli di potabilizzazione e riciclaggio per scopi agricoli.

Inizialmente il refluo è sottoposto a trattamenti preliminari, comprendenti operazioni di grigliatura, dissabbiatura e deoleazione, con lo scopo di rimuovere in esso il materiale grossolano (sabbie e polveri), gli oli, i grassi e i saponi presenti. In seguito il refluo confluisce nelle vasche di sedimentazione, dove subisce processi atti alla rimozione del materiale solido sedimentabile. Qui per decantazione si ha la separazione dei fanghi dalle acque: la frazione solida è inviata alla linea di disidratazione dei fanghi, la frazione liquida invece, è inviata nell'impianto biologico. Tale impianto è composto da una serie di vasche contenenti microrganismi, principalmente batteri, che, utilizzando come nutrienti per i loro cicli vitali le sostanze organiche inquinanti, le degradano. Questa fase del processo è nota come fango attivo e avviene nelle vasche note come vasche di ossidazione. Contemporaneamente questi microrganismi favoriscono la formazione dei fiocchi di fango (bioflocculazione) contenenti le particelle inquinanti degradate. Nel sedimentatore secondario, posto a fianco della vasca di ossidazione, i fiocchi di fango, più pesanti del liquido, si posano sul fondo, permettendo la separazione degli inquinanti dal liquame. I fanghi sono poi raccolti e una parte di questi è riutilizzata per favorire il processo biologico e

mantenere costante la quantità di fango nella vasca di ossidazione. La parte in esubero (fanghi di supero) è convogliata nella linea fanghi per i successivi trattamenti. Complessivamente questo trattamento permette la rimozione del materiale organico sospeso in percentuali superiori all' 85%. Infine l'effluente in uscita dall'impianto biologico è sottoposto a una nuova fase di sedimentazione (sedimentazione secondaria) e a un trattamento terziario che consiste in una filtrazione, per eliminare quelle particelle sospese sfuggite alla fase di sedimentazione e in un processo di disinfezione che si avvale di metodi chimici e/o fisici per l'abbattimento dei microrganismi patogeni presenti. In questa fase di sterilizzazione i principali sistemi usati sono: irraggiamento UV, clorazione, ossidazione con ozono o con acido perossiacetico.



Figura 3. Schema di funzionamento di un impianto di trattamento delle acque reflue

La radiazione UV con massimo effetto germicida è rappresentata dalla linea spettrale di 254 nm. A tale lunghezza d'onda gli acidi nucleici hanno il loro massimo di assorbimento.

I raggi UV inducono, attraverso processi fotochimici, la dimerizzazione delle basi pirimidiniche, portando nel DNA alla lisi dell'elica con conseguenti effetti letali (Sinha e Häder, 2002) e rendono i microrganismi incapaci di replicarsi per inattivazione del RNA. Il trattamento con UV può quindi essere utilizzato per depurare le acque da batteri e virus senza aggiunta di sostanze chimiche.

L'acido perossiacetico è un peracido organico. È un reagente liquido, commercializzato come miscela quaternaria di equilibrio (acido acetico, acqua ossigenata, acqua e acido perossiacetico) e usato come disinfettante. La sua attività disinfettante è basata sul rilascio di ossigeno attivo (Liberti e Notarnicola, 1999) ciò lo rende un potente ossidante aspecifico con ampio spettro d'azione (Kitis, 2003). Esso presenta il vantaggio di avere prodotti di degradazione non tossici o mutagenici ma il suo utilizzo è fortemente condizionato dallo svantaggio di avere un costo elevato.

L'ozono è un ossidante molto forte, in grado di ossidare diversi elementi essenziali delle cellule (enzimi, proteine, DNA, RNA). Esso garantisce la formazione di un basso numero di sottoprodotti nelle reazioni con sostanze organiche residue nei liquami (Richardson *et al.*, 2000).

La clorazione è il metodo di disinfezione più usato nel mondo. In Italia è considerevolmente applicato per la potabilizzazione delle acque.

Il cloro è il disinfettante con il più ampio spettro d'azione, pur presentando un potere ossidante inferiore rispetto agli altri metodi elencati.

<b>Disinfettante</b>	<b>EV (elettronvolt)</b>
Ozono (O <sub>3</sub> )	2,07
Acido perossiacetico (CH <sub>3</sub> COOOH)	1,81
Acido ipocloroso (HOCl)	1,49
Ipoclorito di sodio (NaOCl)	1,36
Diossido di cloro (ClO <sub>2</sub> )	0,95

Tabella 1. Potere ossidante dei vari disinfettanti

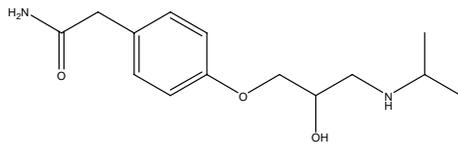
L'acido ipocloroso che è prodotto dalla reazione chimica di tutti gli agenti disinfettanti a base di cloro è il vero agente disinfettante. Esso penetra come molecola neutra all'interno della membrana cellulare e qui svolge la sua funzione da ossidante. Ossidando le funzioni chimiche dei sistemi enzimatici intracellulari, necessari per il metabolismo delle cellule, induce l'inattivazione del microrganismo.

La sua efficacia è determinata dalle dosi e dal tempo di contatto perché il tempo di disattivazione varia da microrganismo a microrganismo. Esso può essere aggiunto al refluo in diverse forme, come gas (Cl<sub>2</sub>), tossico e corrosivo, e per tale motivo più difficile da usare, come ipoclorito in soluzione acquosa, facilmente dosabile (NaClO, KClO, Ca(ClO)<sub>2</sub>). Recentemente il biossido di cloro (ClO<sub>2</sub>), composto gassoso molto instabile, ha iniziato a sostituire l'uso d'ipoclorito poiché riduce la formazione di cloderivati pericolosi, ma il suo utilizzo è ancora limitato a casi particolari a causa del suo costo elevato. Negli USA invece il cloro è addizionato sotto forma di cloroammine, sostanze piuttosto stabili ma con potere disinfettante inferiore. La presenza di residui di cloro può prolungare l'efficienza

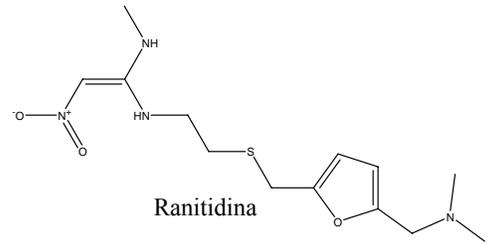
della disinfezione. Prima di essere scaricato nelle acque riceventi, il refluo deve essere sottoposto a un processo finale di dechlorazione se in esso sono presenti tali residui. Infatti, concentrazioni anche molto ridotte di cloro sono tossiche per gli organismi acquatici e devono essere eliminate poiché comportano un rischio per l'ambiente.

Quando nel refluo sono presenti microinquinanti organici come i farmaci, come già accennato, tali sostanze usate per la disinfezione possono reagire chimicamente con essi. Come già riportato in letteratura, si può avere la formazione di sostanze potenzialmente più tossiche per l'ambiente (Bedner e Maccrehan, 2006; Buth et al., 2007). Nella valutazione del reale rischio ambientale, va quindi tenuta in considerazione la possibilità che, le percentuali di rimozione di un farmaco in un refluo siano frutto non solo della sua mineralizzazione, ma anche della sua capacità di trasformarsi in una differente sostanza chimica durante i processi.

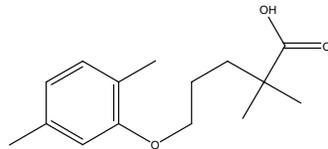
Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato lo studio del chimismo dei farmaci atenololo, ranitidina, naprossene, gemfibrozil, benzafibrato e fenofibrato, tamoxifen, lincomicina, sildenafil e tadalafil, durante il trattamento con ipoclorito in condizioni mimiche di quelle d'impianto.



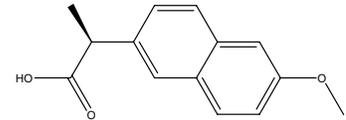
Atenololo



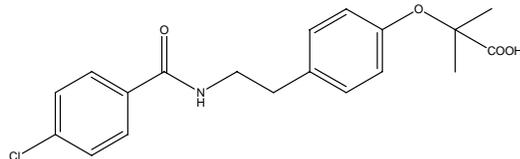
Ranitidina



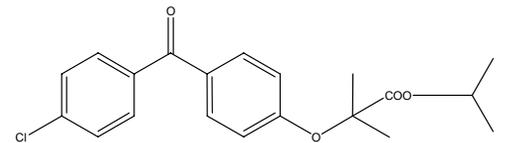
Gemfibrozil



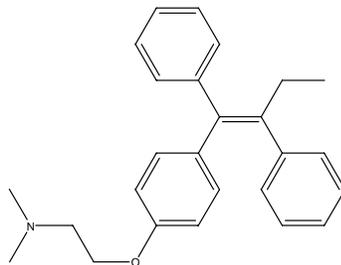
Naprossene



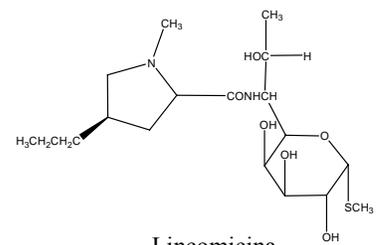
Bezafibrato



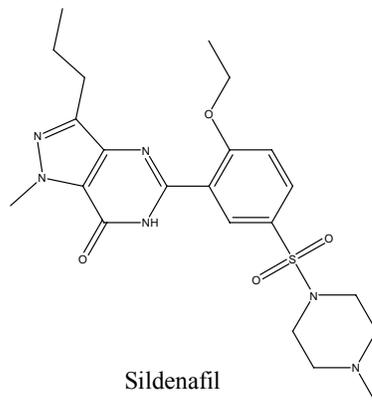
Fenofibrato



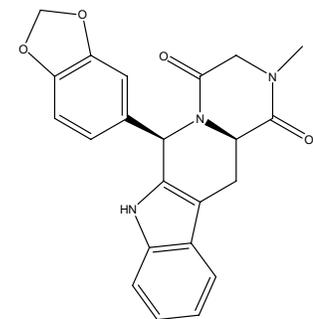
Tamoxifen



Lincomicina



Sildenafil



Tadalafil

L'ipoclorito è stato scelto poiché il trattamento di disinfezione più usato negli *STP* italiani è la clorazione con soluzioni acquose d'ipoclorito di sodio. Inoltre dati di letteratura indicano che durante la disinfezione con ipoclorito è possibile che si generino prodotti di trasformazione, principalmente clorurati (Yamamoto e Yasuhara, 2002; Chen e Lin, 2006; Li e Blatchley III, 2007 e riferimenti interni all'articolo) la cui tossicità è ben nota, come descritto per gli organoclorurati, i PCB o i pesticidi clorurati, come il DDT.

La selezione dei farmaci è avvenuta in funzione di tre parametri: a) presenza nella loro struttura molecolare di gruppi funzionali potenzialmente reattivi al trattamento; b) carico ambientale teorico legato alle loro percentuali di vendita e al loro utilizzo; c) dati di letteratura sul loro ritrovamento negli ecosistemi acquatici e/o negli effluenti di *STP*.

Per molti farmaci selezionati in questo studio è stato in precedenza studiato il comportamento fotochimico e idrolitico alla luce del loro ritrovamento nell'ambiente acquatico e sono noti i loro possibili metaboliti ambientali (Andrisano et al., 1999; Della Greca et al., 2004a; Cermola et al., 2005; Della Greca et al., 2007). Di molti metaboliti ambientali e dei farmaci parentali sono state studiate alcune proprietà tossicologiche al fine di contribuire all'*Environmental Risk Assessment* posto da questo tipo d'inquinanti (Isidori et al., 2005; Isidori et al., 2009).

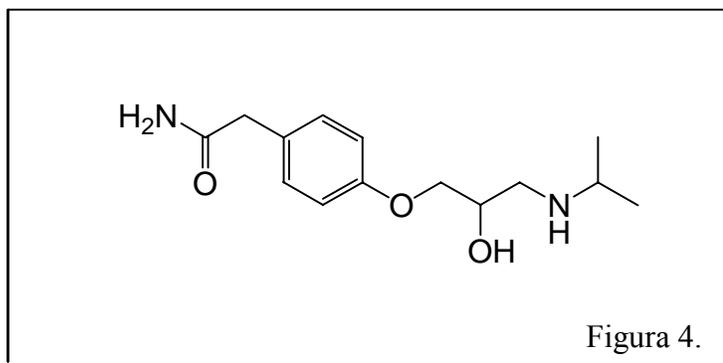
I prodotti derivanti dalla clorazione sono stati isolati cromatograficamente (cromatografia su gel di silice, TLC, HPLC) e

caratterizzati tramite tecniche spettroscopiche (NMR mono e bi-dimensionale, IR, UV) e spettrometriche (EI-MS, ESI-MS e MALDI-MS).

Il potenziale impatto ambientale dei composti parentali e di alcuni loro prodotti, è stato valutato eseguendo saggi di fitotossicità o, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Vita, della Seconda Università di Napoli, saggi di tossicità acuta e cronica su alcuni organismi della catena trofica acquatica, di genotossicità e mutagenicità.

## 2. Farmaci studiati

### 2.1 Atenololo



L'atenololo appartiene alla classe dei  $\beta$ -bloccanti, farmaci utilizzati nella cura delle disfunzioni cardiovascolari. È un antagonista selettivo del recettore  $\beta_1$ -adrenergico. Fu introdotto nel 1976, come sostituto per il propranololo ed è tra i farmaci più prescritti principalmente nella cura dell'ipertensione arteriosa. L'atenololo è usato anche nella cura di alcune forme di aritmia (come ad esempio la tachicardia), della malattia coronarica, nei casi di angina pectoris e nell'intervento precoce nell'infarto miocardico acuto. Dopo la somministrazione orale, l'atenololo è metabolizzato in minime quantità (10% circa) e, dopo circa 48 ore, è escreto per via renale.

L'elevate concentrazioni misurate per l'atenololo negli effluenti degli *STP*, comparate alle sue concentrazioni ambientali, lo classificano

come uno dei principali inquinanti degli ambienti acquatici Italiani (Calamari *et al.*, 2003; Zuccato *et al.*, 2005).

ng/L	STPs	Lambro river	Po river	
	Median		Maximum	Median
Ofloxacin	600.0	306.1	37.0	33.1
Furosemide	585.0	254.7	67.2	3.5
Atenolol	466.0	241.0	41.7	17.2
Hydrochlorothiazide	439.1	255.8	24.4	4.6
Carbamazepine	291.1	175.3	34.2	23.1
Ranitidine	288.2	38.5	4	1.3
Ciprofloxacin	251.0	14.4	26.2	Nd
Sulphamethoxazole	127.2	Nd	Nd	Nd
Ibuprofen	121.2	20.0	17.4	13.0
Spiramycin	75.0	74.2	43.8	9.8
Bezafibrate	54.8	57.2	2.7	1.9
Erythromycin	47.4	4.5	15.9	3.2
Lincomycin	30.5	24.4	248.9	32.6
Clarithromycin	18.1	8.3	20.3	1.6
Salbutamol	8.7	2.5	1.7	1.1
Amoxicillin	4.7	Nd	Nd	Nd
Cyclophosphamide	0.6	Nd	Nd	Nd
Diazepam	0.0	Nd	Nd	Nd
Enalapril	0.0	0.5	0.1	0.1
Ethinylestradiol	0.0	Nd	Nd	Nd
Methotrexate	0.0	Nd	Nd	Nd
Omeprazole	0.0	Nd	Nd	Nd

Tabella 2. Farmaci negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue (STP) e nelle acque superficiali del Po e del Lambro (i valori medi sono stati calcolati su nove siti di campionamento per gli STP e sette per il fiume Po).

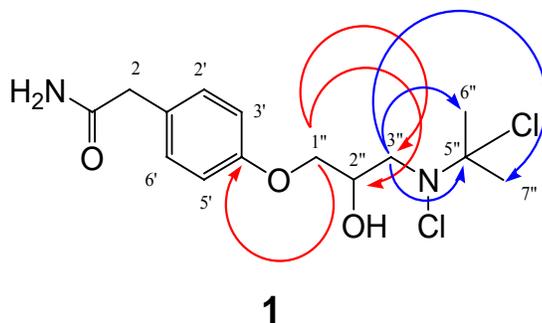
Inoltre dati bibliografici riportano che la concentrazione dell'atenololo negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue è inferiore alla sua concentrazione d'immissione (Castiglioni *et al.*, 2006) indicando la possibilità che il farmaco abbia reagito durante le fasi previste per la depurazione del refluo.

### 2.1.1 Risultati e discussione

Gli esperimenti di clorazione con ipoclorito di sodio, cui è stato sottoposto il farmaco (Figura 4), hanno dimostrato la sua elevata reattività nei confronti di questo trattamento (Della Greca *et al.*, 2009).

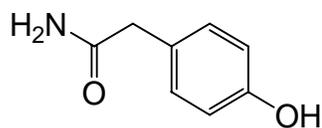
Negli esperimenti, sia con rapporto molare atenololo/ipoclorito 1:1.5 sia in eccesso di ipoclorito, dopo un'ora di reazione, si ha la completa trasformazione del farmaco, come provato dall'analisi TLC e  $^1\text{H}$  NMR. La purificazione cromatografica della miscela di reazione ha permesso di isolare i tre principali prodotti **1**, **2** e **3**. Gli stessi prodotti sono stati isolati anche nelle miscele di reazione derivanti dagli esperimenti con eccesso d'ipoclorito (rapporto molare atenololo/ipoclorito 1:8), cioè negli esperimenti mimici delle condizioni del trattamento di disinfezione. Il quench con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dell'eccesso d'ipoclorito porta, come evidenziato dall'analisi HPLC, all'assenza del composto **1**, alla presenza di atenololo e all'isolamento di un altro prodotto, il composto **4**. Riducendo i tempi di reazione (30 minuti) la miscela di reazione contiene solo i composti **1** e **4**. Tutti i composti sono stati identificati mediante tecniche spettroscopiche.

Il composto **1** è stato identificato come un dicloroderivato dell'atenololo con formula  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ . L'analisi dei dati spettrali e il confronto con i dati dell'atenololo hanno permesso di attribuire la seguente struttura:



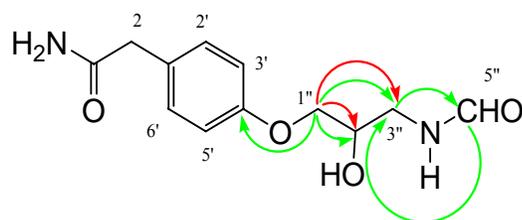
Lo spettro di massa ESI<sup>+</sup> mostra due picchi, uno a  $m/z$  321.0 imputabile allo ione  $[M-HCl+Na]^+$  e uno a  $m/z$  299.0, imputabile allo ione  $[M-HCl+H]^+$ . Nello spettro <sup>13</sup>C NMR sono presenti i segnali di dodici carboni, assegnati mediante uno spettro DEPT a due metili, tre metileni, tre metini e quattro carboni quaternari. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR presenta due doppietti a  $\delta$  7.21 (2H, d,  $J= 9.0$  Hz, H-2' e H-6'), e 6.90 (2H, d,  $J= 9.0$  Hz, H-3' e H-5'), tipici di un anello aromatico 1,4-disostituito. Questi protoni sono correlati in un esperimento HSQC con i segnali dei carboni, rispettivamente, a  $\delta$  131.8 e 116.2. L'esperimento H-H COSY ha mostrato correlazioni tra i segnali dei protoni a  $\delta$  4.09 (2H, d,  $J= 4.9$  Hz, H-1''), 4.58 (1H, m, H-2''), 3.76 e 3.64 (2H, dd,  $J= 12.7, 6.8, 7.8$  Hz, H-3''), correlati nell'esperimento HSQC ai carboni a  $\delta$  71.1, 76.0 e 63.2, indicando la presenza di un gruppo 3-amminopropil-1,2-diolo. Inoltre nello spettro <sup>1</sup>H NMR sono presenti i singoletti corrispondenti ai protoni metilenici H-2 a  $\delta$  3.44, e ai metili H-6'' e H-7'' a  $\delta$  1.48. Le correlazioni HMBC tra i protoni H-1'' e i carboni C-4'', C-2'' e C-3'' e tra i protoni H-3'', C-6'' e C-7'' e il carbonio quaternario C-5'' confermano la struttura assegnata.

Il prodotto **2** è stato identificato come la 2-(4-idrossifenil)acetammide, comparandone i dati spettrali con i dati disponibili per il prodotto commerciale.



**2**

Il composto **3** ha formula molecolare  $C_{12}H_{16}N_2O_4$  in accordo con lo ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  253.1 nello spettro di massa ESI<sup>+</sup>.



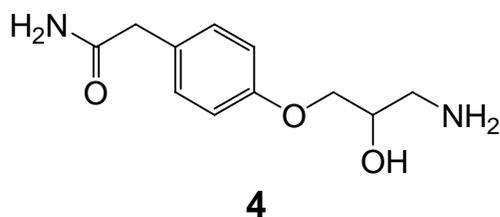
**3**

Nello spettro  $^{13}C$  NMR sono presenti dieci segnali identificati come quattro carboni quaternari, tre metileni, quattro metini tramite

l'esperimento DEPT. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR mostra due doppietti a  $\delta$  7.21 (2H, d,  $J= 8.5$  Hz, H-2' e H-6'), e a  $\delta$  6.90 (2H, d,  $J= 8.5$  Hz, H-3' e H-5') per la presenza di un anello aromatico 1,4-disostituito. Questi protoni sono correlati in un esperimento HSQC rispettivamente ai segnali dei carboni a  $\delta$  131.7 e 116.2. L'esperimento COSY ha evidenziato le omo-correlazioni tra i segnali protonici a  $\delta$  3.94 (2H, m, H-1''), 4.02 (1H, m, H-2''), 3.53 e 3.44 (2H, dd,  $J= 13.7, 6.8, 4.9$  Hz, H-3''). Questi segnali sono correlati nell'esperimento HSQC ai carboni a  $\delta$  70.2, 71.6 e 42.5, correlazioni dovute, anche in questo caso, alla presenza del gruppo 3-amminopropil-1,2-diolico.

Inoltre nello spettro  $^1\text{H}$  NMR è presente il protone H-2 metilenico a  $\delta$  3.44 e il protone H-5'' a  $\delta$  8.10 (1H, s, H-5''). Nello spettro HMBC sono presenti correlazioni long-range tra i protoni H-1'' e i carboni C-4', C-2'' e C-3'', tra il H-3'' e il carbonio metinico C-5'' e tra il protone H-5'' e il carbonio C-3''. Tutti questi dati hanno contribuito a identificare il composto **3** come la 2-(4-(3-formammido-2-idrossipropossi)fenil)acetammide.

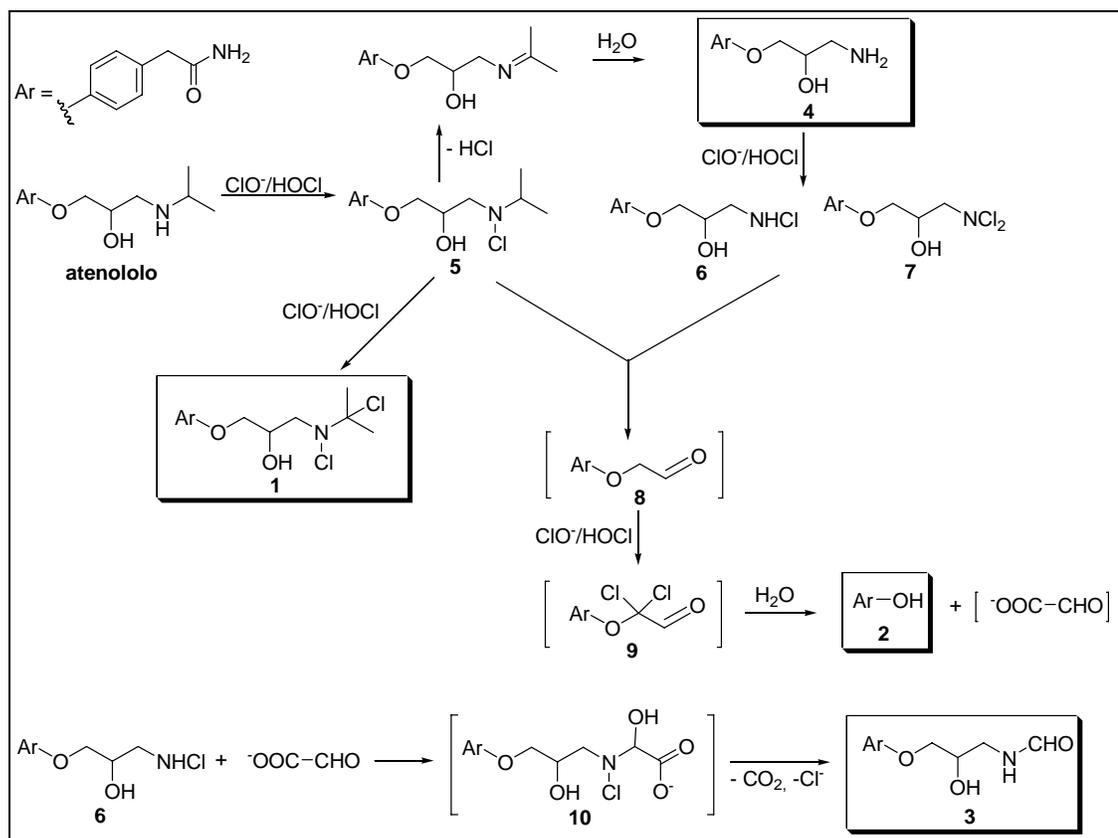
Infine il composto **4** è stato identificato come la 2-(4-(3-ammino-2-idrossipropossi)fenil)acetammide.



Nello spettro di massa ESI<sup>+</sup> è presente il segnale dello ione pseudo molecolare [M+H]<sup>+</sup> a  $m/z$  225.0, in accordo con la formula molecolare C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR mostra due segnali di doppietto a  $\delta$  7.22 e 6.90 dell'anello aromatico 1,4-disostituito, un multipletto a  $\delta$  3.95, un singoletto a  $\delta$  3.44, e due doppi doppietti uno a  $\delta$  2.89 e uno a  $\delta$  2.76.

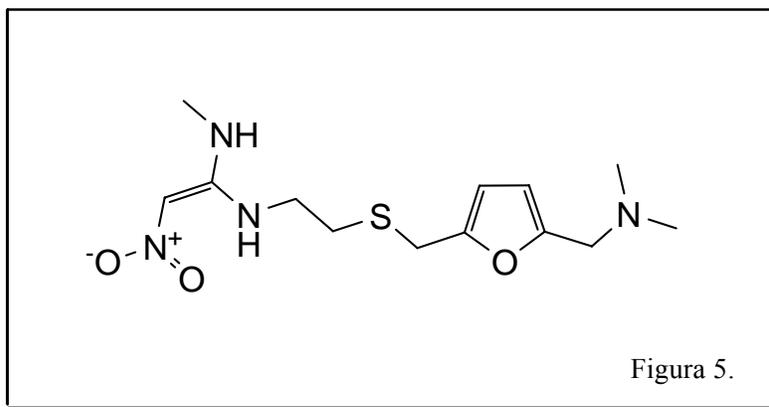
Per ottenere informazioni sul possibile meccanismo coinvolto nella formazione dei composti **1-3** (Schema 1) sono stati condotti esperimenti di clorazione a diversi tempi e analizzate le miscele di reazione mediante LC/MS. Nel cromatogramma ottenuto iniettando la miscela di clorazione dopo 10 minuti sono presenti l'ammina **4**, N-cloroatenololo (composto **5**), N-cloroammina del prodotto **4** (composto **6**) e l'N,N-dicloroammina del prodotto **4** (composto **7**), tutti composti che, dopo 1 h di clorazione, scompaiono dalla miscela come comprovato dall'analisi HPLC/MS. Come già noto in letteratura per le ammine secondarie e per il metoprololo, farmaco strutturalmente molto simile all'atenololo (Armesto et al., 1998; Pinkston e Sedlak, 2004), durante la reazione con ipoclorito, l'atenololo può subire una N-clorazione sul gruppo amminico secondario e per successiva perdita di HCl e idrolisi dell'immina intermedia si ha la formazione dell'ammina primaria **4**. La frammentazione degli (N-cloro)-amminoalcoli (**5-7**) porta all'aldeide (composto **8**) (Armesto et al., 1997). Questo composto aldeidico può reagire con l'ipoclorito in una reazione aloformica, come osservato anche per i chetoni non-metilici

(Rothenberg e Sasson, 1996), dando  $\alpha,\alpha$ -dicloroaldeide (composto **9**). Dall'idrolisi del composto **9** è possibile ottenere il prodotto **2**. L'altro prodotto dell'idrolisi è una molecola di gliossilato la quale può reagire ulteriormente con il composto **6** portando alla formazione di un intermedio di tipo N-cloro emiamminale (composto **10**) (Böhme e Sadanandam, 1973; Joo e Mitch, 2007), il quale si decompone giustificando la formazione del prodotto **3**.



Schema 1: Ipotesi di formazione proposta per i prodotti generatisi dalla reazione dell'atenololo con ipoclorito. Le strutture nelle cornici rappresentano i prodotti isolati. Le strutture nelle parentesi quadre rappresentano gli intermedi di reazione proposti solo sulla base dei dati bibliografici.

## 2.2 Ranitidina



La ranitidina è un farmaco gastrointestinale con funzione di antagonista del recettore istaminico H<sub>2</sub>, serve a diminuire la produzione di succhi gastrici ed è comunemente usata per la cura di ulcere benigne gastriche e duodenali, esofagiti da reflusso e dispepsie croniche. La principale via di escrezione della ranitidina sono le urine e circa il 40% della dose orale somministrata viene escreta non metabolizzata entro 24 ore.

In vari paesi, compresa l'Italia, i preparati contenenti ranitidina sono disponibili come *Over-the-counter (OTC) drugs*, cioè farmaci venduti senza bisogno di prescrizione medica.

La ranitidina è stata ritrovata in differenti ambienti acquatici, con concentrazioni medie pari a 288.2 ng/L negli effluenti degli *STP* italiani e valori variabili dai 38.5 ai 4.0 ng/L nelle acque di fiume (Zuccato et al., 2005, Tabella 2).

Anche nel caso della ranitidina le concentrazioni a monte e a valle degli STP risultano differenti (Castiglioni *et al.*, 2006, Tabella 3), con percentuali di rimozione pari circa al 72%.

pharmaceutical	load in influent (mg/day/1000 inh)		load in effluent (mg/day/1000 inh)	
	median <sup>b</sup>	range <sup>b</sup>	median <sup>b</sup>	range <sup>b</sup>
amoxicillin	13	nd-88	nd	nd-68
atenolol	494	134-1029	281	155-966
bezafibrate	50	20-682	29	4-79
carbamazepine	12	nd-386	28	nd-422
cyclophosphamide	nd	nd	nd	nd-1
ciprofloxacin	259	120-507	97	37-271
clarithromycin	21	nd-46	55	nd-421
clofibric acid	nd	nd-25	0.4	nd-18
demethyl diazepam	1.1	nd-19	1.6	0.5-13
diazepam	0.4	nd-1.4	0.5	nd-1
enalapril	31	nd-61	1.2	nd-58
erythromycin	nd	nd-1	5	nd-161
17 $\beta$ -estradiol	nd	nd-4	nd	nd
estrone	5.4	nd-28	6.4	nd-20
17 $\alpha$ -ethinylestradiol	nd	nd	nd	nd
furosemide	277	9-835	195	72-644
ibuprofen	122	nd-324	28	nd-162
hydrochlorothiazide	354	58-845	415	55-745
lincomycin	3.4	nd-65	5.4	0.5-183
methotrexate	nd	nd-3	nd	nd
oleandomycin	nd	nd-0.2	nd	nd-0.8
ofloxacin	360	83-614	233	28-268
omeprazole	nd	nd	nd	nd
oxytetracycline	nd	nd	nd	nd
ranitidine	188	87-520	96	21-266
salbutamol	4.3	1-9	4	2-8
spiramycin	4.8	nd-47	35	12-418
sulfamethoxazole	65	nd-209	10	nd-304
tilmicosin	nd	nd	nd	nd
tylosin	0.1	nd-2	nd	nd-1.4

Tabella 3. Carichi medi dei farmaci negli influenti ed effluenti di sei STP, normalizzati in base al numero di abitanti per ciascun impianto ed espressi in mg/giorno/1000 abitanti.

## 2.2.1 Risultati e discussione

La ranitidina (Figura 5) è stata sottoposta a esperimenti con ipoclorito a differenti concentrazioni e diversi tempi di contatto.

L'analisi TLC e <sup>1</sup>H NMR delle miscele derivanti da esperimenti con un rapporto molare farmaco/ipoclorito pari a 1:2 hanno mostrato la presenza di una frazione di farmaco inalterata a tutti i tempi di contatto

testati (2', 10', 1h). Attraverso la purificazione cromatografica di queste miscele di reazione è stato possibile isolare tre principali prodotti **11**, **12** e **13**. Mantenendo la concentrazione d'ipoclorito costante ma aumentando i tempi di contatto, si ha una maggiore trasformazione del farmaco e rese maggiori dei prodotti e di conseguenza il recupero di una minore quantità di farmaco iniziale. Aumentando le concentrazioni d'ipoclorito sino a quelle tipiche degli impianti (ranitidina/ipoclorito 1:10), il farmaco si trasforma quantitativamente con formazione oltre ai prodotti **11-13**, di un altro prodotto di clorazione, **14**.

L'analisi dei dati spettrali e il confronto con i dati della ranitidina ha permesso di attribuire ai prodotti le seguenti strutture:

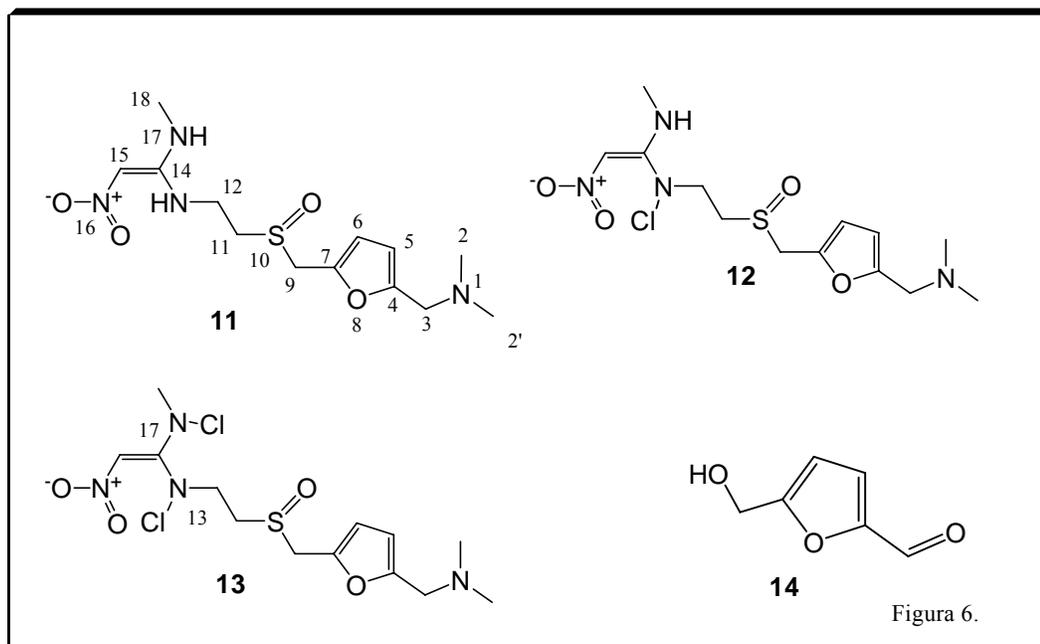
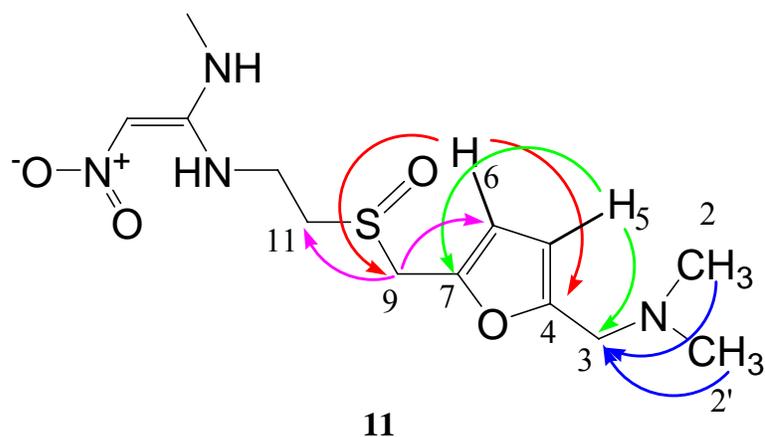


Figura 6.

Nello spettro di massa ESI<sup>+</sup> del prodotto **11**, è presente il segnale dello ione pseudo molecolare [M+H]<sup>+</sup> a  $m/z$  331.1, in accordo con la formula molecolare C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S.

Nello spettro <sup>13</sup>C NMR sono presenti i segnali di undici carboni assegnati dallo spettro DEPT a due metili, quattro metileni, due metini e tre carboni quaternari. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR presenta due doppietti a  $\delta$  6.45 (1H, d,  $J$ = 3.1 Hz, H-6), e 6.35 (1H, d,  $J$ = 3.1 Hz, H-5). Questi segnali, corrispondenti a quelli dell'anello furanico nello spettro della ranitidina registrato nel medesimo solvente deuterato (CD<sub>3</sub>OD), sono correlati in un esperimento HSQC con i segnali dei carboni, rispettivamente, a  $\delta$  114.4 e 113.6. Sono inoltre presenti nello spettro <sup>1</sup>H NMR i singoletti corrispondenti ai protoni metilici a  $\delta$  2.90 (3H, s, H-18) e 2.40 (6H, s, H-2 e H-2') e ai protoni metilenici H-3 a  $\delta$  3.72, correlati, nell'esperimento HSQC rispettivamente ai carboni a  $\delta$  31.2 (C-18),  $\delta$  45.0 (C-2, C-2') e  $\delta$  56.1 (C-3). L'esperimento H-H COSY mostra omo-correlazione tra i segnali a  $\delta$  4.22 (1H, d,  $J$ = 14.0 Hz, H<sub>a</sub>-9) e 4.34 (1H, d,  $J$ = 14.0 Hz, H<sub>b</sub>-9) e tra i segnali a  $\delta$  3.70 (2H, m, H-12), 3.20 (1H, m, H<sub>a</sub>-11), 3.00 (1H, m, H<sub>b</sub>-11). Le correlazioni HMBC, tra i protoni H-9 e i carboni C-6 e C-11, tra il protone H-5 e i carboni C-3 e il carbonio quaternario C-7, tra il protone H-6 e i carboni C-4 (quaternario) e C-9 e infine, tra i protoni metilici H-2 e H-2' e il carbonio C-3, confermano la struttura assegnata.



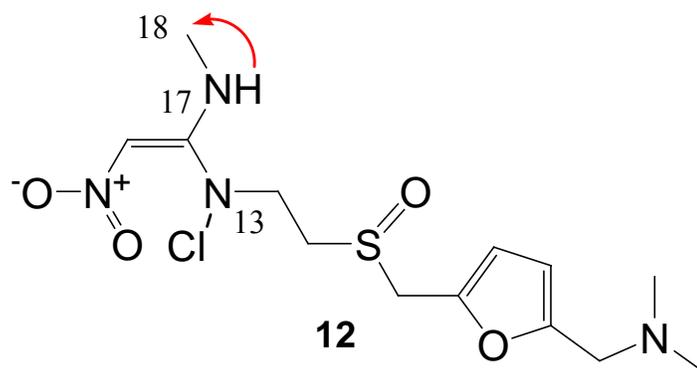
Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del prodotto **12**, registrato in  $\text{CD}_3\text{OD}$ , presenta molte analogie con lo spettro del composto **11**.

Nello spettro di massa  $\text{ESI}^+$  è presente uno ione pseudo molecolare a  $m/z$  365.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  con picco isotopico a  $m/z$  367.0  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  (33%). Tale ione pseudo molecolare è in accordo con una formula molecolare  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ . Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del prodotto **12** molto simile a quello del prodotto **11** porta ad ipotizzare che la clorazione sia avvenuta a carico di uno dei gruppi amminici presenti sulla molecola. Tale reattività già osservata sul primo farmaco studiato ed è riportata in letteratura per i gruppi amminici secondari (Pinkston e Sedlak, 2004).

Per stabilire la posizione di N-clorazione, gli esperimenti NMR di questo prodotto sono stati registrati in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .

Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR sono presenti i segnali di dieci carboni assegnati dallo spettro DEPT a due metili, quattro metileni, due metini e due carboni quaternari.

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR presenta tre singoletti, corrispondenti ai protoni metilici a  $\delta$  2.93 (3H, s, H-18) e 2.63 (6H, s, H-2 e H-2') e ai protoni metilenici a  $\delta$  4.26 (2H, s, H-3), correlati in un esperimento HSQC rispettivamente ai carboni a  $\delta$  31.0 (C-18),  $\delta$  41.6 (C-2, C-2') e  $\delta$  51.5 (C-3). Nello spettro sono inoltre presenti un singoletto slargato a  $\delta$  9.00 e i segnali di due doppietti a  $\delta$  6.69 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-6) e 6.51(1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-5), correlati nell'esperimento HSQC rispettivamente al segnale a  $\delta$  112.5 e 115.6. L'esperimento COSY mostra omocorrelazione tra i segnali a  $\delta$  4.20 (1H, d,  $J= 14.0$  Hz,  $H_a$ -9) e 4.35 (1H, d,  $J= 14.0$  Hz,  $H_b$ -9) e tra i segnali a  $\delta$  3.68 (2H, m, H-12), 3.21 (1H, m,  $H_a$ -11), 3.00 (1H, m,  $H_b$ -11), correlati nell'esperimento HSQC rispettivamente ai carboni a  $\delta$  49.3, 49.9 e 38.5. Questi dati confermano la presenza di una catena metilsolfinil-etilica che conferma l'ipotesi di ossidazione dell'atomo di zolfo nella struttura. Infine l'omo-correlazione del protone a  $\delta$  9.00 con i protoni H-18 a  $\delta$  2.93 permette di attribuire tale segnale al protone in posizione 17, indicando che la posizione di clorazione è sull'N-13.



Nell'esperimento HMBC sono presenti correlazioni long-range tra il H-5 e i carboni C-3 e C-7, tra il protone H-6 e i carboni C-9 e C-4, tra i protoni H-9 e il C-11, tra H-12 e il carbonio quaternario C-14, tra i protoni metilici H-2/H-2' e il carbonio metinico C-3. Tutti questi dati confermano la struttura assegnata al prodotto **12**.

Il prodotto **13** ha formula molecolare  $C_{13}H_{20}Cl_2N_4O_4S$  in accordo con lo ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  399.8 con picchi isotopici a  $m/z$  401.8  $[M+2+H]^+$  (65%) e 403.8  $[M+4+H]^+$  (10%).

Lo spettro  $^1H$  NMR mostra due doppietti a  $\delta$  6.43 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-6), e 6.34 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-5), dell'anello furanico 2,5-disostituito, due singoletti a  $\delta$  2.40 (6H, s, H-2 e H-2') 3.55 (2H, s, H-3), del gruppo (N,N-dimetilammino) metilico, due doppietti a  $\delta$  4.29 (1H, d,  $J= 14.5$  Hz,  $H_a$ -9) e 4.11 (1H, d,  $J= 14.5$  Hz,  $H_b$ -9), tre multipletti a  $\delta$  3.10 (1H, m,  $H_a$ -11), 2.90 (1H, m,  $H_b$ -11) e 3.65 (2H, m, H-12) della catena metilsolfinil-etilica ed infine il singoletto metilico a  $\delta$  3.10 (3H, s, H-18). Gli spettri  $^1H$  NMR e  $^{13}C$  NMR del prodotto **13** mostrano molte analogie con gli spettri del prodotto **11**. Le posizioni dei due clori sono attribuibili ai due azoti N-13 e N-17 (Figura 6).

Il prodotto **14** è stato identificato come la 5-(idrossimetil)-2-furaldeide (Figura 6), comparandone i dati spettrali con i dati disponibili per il prodotto commerciale.

Le reazioni di N-clorazione di gruppi amminici secondari con ipoclorito sono ben note in letteratura (Armesto et al., 1998). Dati di letteratura riportano inoltre che soluzioni acquose di NaOCl possono

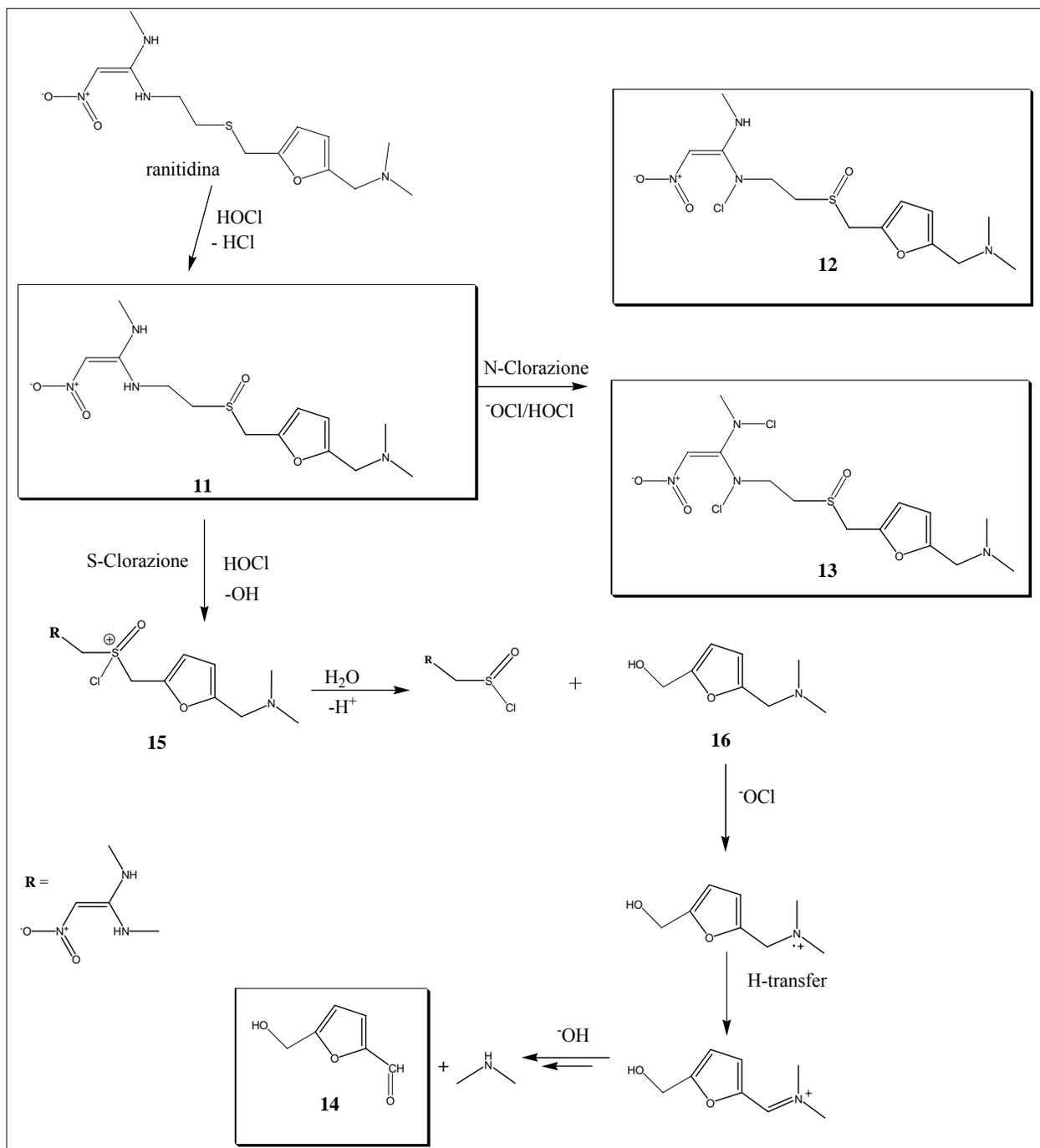
indurre l'ossidazione di diversi tipi di solfuri ai corrispondenti solfossidi (Kowalski et al., 2005). Le specie reattive in questo processo di ossidazione sono fortemente dipendenti dal pH. In particolare, essendo i valori di pH 8÷10, in soluzione sono presenti HOCl e  $^-OCl$  in equilibrio ( $pK_a$  HOCl= 7.5). Tali dati giustificano la formazione durante gli esperimenti, dei tre prodotti **11**, **12** e **13**. L'ipotesi di formazione del prodotto **14** prevede, in eccesso d'ipoclorito, una S-clorazione del solfossido (**11**) con la formazione di uno ione clorosolfossonio intermedio **15**.

Questo tipo di S-clorazione è stato descritto per la clorazione di un altro farmaco, la cimetidina (Buth et al., 2007) ed è stato proposto in precedenza per la clorazione di dialchil solfossidi, nella sintesi di  $\alpha$ -clorosolfossidi (Cinquini et al., 1972; Klein e Stollard, 1973). Il successivo probabile passaggio è l'attacco di acqua al metilene legato all'anello furanico con formazione del 5-N,N-dimetilaminometil-2-furilmetanolo (**16**) e del cloruro di solforile.

La rottura del legame C-S è stata osservata per ioni clorosolfossonio sostituiti da gruppi 2-(trimetilsilil)etilici che stabilizzano la formazione del carbocatione incipiente sul legame S-C (Schwan et al., 2001). Tal effetto stabilizzante potrebbe nel caso della ranitidina, essere imputato all'anello furanico. L'ipoclorito ossida infine il gruppo amminico terziario presente nel composto **16**.

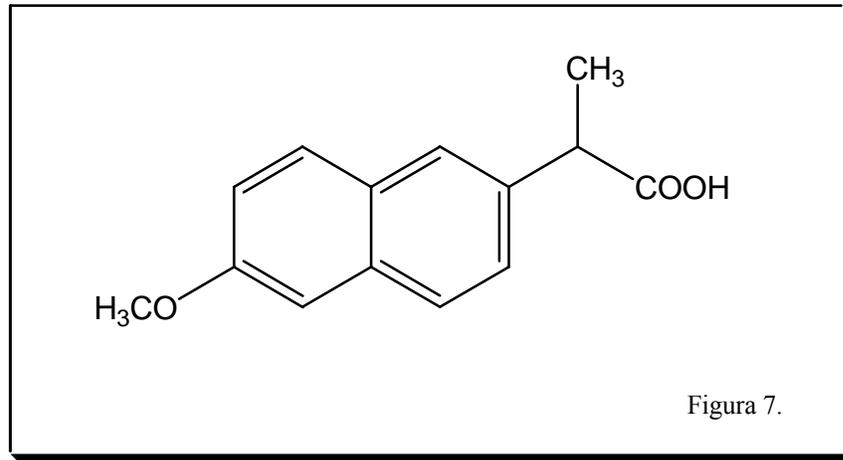
In letteratura non sono riportati meccanismi di ossidazione per ammine terziarie con ipoclorito mentre è descritta l'ossidazione fotochimica (Nanni e Sawyer, 1980), elettrochimica (Masui et al., 1968) e per reazione con agenti chimici ossidanti diversi dall'ipoclorito

(Rosenblatt *et al.*, 1967; Audeh e Lindsay Smith, 1970). L'ossidazione avviene per estrazione di un elettrone e formazione di un radicale catione; questo stadio lento è seguito da un veloce H-transfer, con formazione dello ione imminio più stabile. L'imminio in soluzione acquosa basica subisce apertura portando alla formazione del prodotto **14**. A conferma dell'ipotesi di formazione (Schema 2), il composto **16** è stato sintetizzato (Haywood *et al.*, 1987) e sottoposto ad esperimenti di clorazione. Attraverso purificazione cromatografica della miscela di reazione dopo circa 20 minuti, si isola il composto **14**, come comprovato dalle analisi NMR e di massa del prodotto.



Schema 2. Ipotesi proposta per la formazione dei prodotti nella reazione della ranitidina con ipoclorito. Le strutture in cornice rappresentano i prodotti isolati.

## 2.3 Naprossene



Il naprossene è un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS), con proprietà antinfiammatorie, analgesiche e antipiretiche. Appartiene alla famiglia degli arilpropionici o "profeni", inibisce le cicloossigenasi e quindi la sintesi delle prostaglandine. Studi farmacocinetici hanno mostrato che approssimativamente il 10 % del farmaco è escreto per via urinaria, immodificato.

Esistono numerosi dati circa la presenza di questo farmaco sia in acque superficiali sia negli effluenti degli *STP* di diversi Paesi europei (Ternes, 1998; Öllers et al., 2001; Heberer, 2002; Tixier et al., 2003; Lindqvist et al., 2005; Santos et al., 2007) e, come mostrato in tabella 4, sono presenti in letteratura anche i dati di comparazione tra le concentrazioni del naprossene in vari *STP* (Andreozzi et al., 2003).

Tabella 4. Concentrazioni di farmaci ( $\mu\text{g/L}$ ) rilevate nelle acque degli effluenti di STPs (Andreozzi *et al.*, 2003)

	France		Greece	Italy			Sweden	Median- Maximum	Germany and Switzerland (* literature data)
	S1-F	L1-F	L2-GR	M1-I	L3-I	L4-I	L5-S		
<i>Lipid regulators</i>									
→ Gemfibrozil	1.34	0.06	0.71	0.81	0.84	<u>4.76</u>	2.07	0.84–4.76	0.4–1.5
Fenofibrate	0.12	0.02	0.16	0.16	0.1	<u>0.16</u>	n.d.	0.14–0.16	n.d.–0.03
Bezafibrate	n.d.	1.07	n.d.	n.d.	n.d.	0.91	n.d.	n.d.–1.07	2.2–4.6
Clofibrate	n.d.	n.d.	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.–0.8	n.d.
Clofibric acid	n.d.	n.d.	n.d.	0.68	n.d.	0.23	0.46	n.d.–0.68	0.36–1.6 (n.d.–0.06*)
<i>Antiphlogistics</i>									
Ibuprofen	1.82	0.02	0.05	0.18	0.02	0.02	7.11	0.05–7.11	0.37–1.2 (<0.1–1.5*)
Fenoprofen	0.28	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.–0.28	n.d.
Flurbiprofen	0.21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	n.d.	n.d.–0.34	n.r.
→ Naproxen	1.73	0.51	n.d.	0.29	0.41	<u>5.22</u>	2.15	1.12–5.22	0.3–0.42 (0.1–3.5*)
Ketoprofen	n.d.	1.62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.–1.62	0.20–0.38 (n.d.–0.2*)
Diclofenac	0.41	0.25	0.89	0.47	1.48	5.45	n.d.	0.68–5.45	0.81–2.1 (0.1–0.7*)
Phenazone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.37	n.d.	n.d.	n.d.–0.37	0.16–0.41
Aminopyrine	0.43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.–0.43	n.d.–1.0
<i><math>\beta</math>-Blockers</i>									
Acebutolol	0.13	0.08	0.01	0.04	0.02	0.11	<0.01	0.06–0.13	n.r.
Metoprolol	0.08	0.08	0.1	0.01	0.01	0.1	0.39	0.08–0.39	0.73–2.2
Oxprenolol	0.05	0.02	0.01	0.01	<0.01	0.03	n.d.	0.02–0.05	n.r.
Propranolol	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01	0.09	0.01	0.01–0.09	0.17–0.29
Betaxolol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06–0.19
<i>Antiepileptic</i>									
Carbamazepine	0.98	1.2	1.03	0.3	0.34	0.5	0.87	0.87–1.2	2.1–6.3 (0.1–0.8*)
<i>Antibiotics</i>									
Trimetoprim	0.04	0.02	0.08	0.04	0.03	0.13	0.05	0.04–0.13	0.32–0.66
Sulfamethoxazole	0.09	0.07	0.09	0.01	n.d.	0.03	0.02	0.05–0.09	0.40–2.0
<i>Antibiotics–fluoroquinolones</i>									
Ofloxacin	0.33	0.51	0.46	0.58	0.29	0.31	0.12	0.33–0.58	n.r.
Lomefloxacin	0.18	0.19	0.29	0.32	0.18	0.22	0.13	0.19–0.32	n.r.
Enoxacin	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01	0.03	0.01	0.03–0.03	n.r.
Norfloxacin	0.05	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.03	0.06–0.08	0.05–0.12*
Ciprofloxacin	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	0.04	0.03	0.06–0.07	0.05–0.11*

n.d.: not detected; n.r.: not reported previously; literature data: median and maximum values (Ternes, 1998; Hirsch *et al.*, 1999) for Germany and concentration range (Golet *et al.*, 2001; Öllers *et al.*, 2001) for Switzerland.

Precedenti studi riportano la capacità di questo farmaco di subire trasformazione durante il processo di clorazione, nel range di pH tipicamente riscontrato nelle acque reflue (Pinkston e Sedlak, 2004). I dati riportano la misura delle velocità di reazione nell'intervallo di pH 5÷10 ma non l'isolamento e la caratterizzazione dei prodotti.

Altri studi effettuati sul naprossene riportano che, durante il trattamento con cloro libero, il farmaco è trasformato e non mineralizzato (Boyd *et al.*, 2005). I dati evidenziano che la formazione dei prodotti varia al variare del pH, delle dosi di cloro e del tempo di contatto ma principalmente che è molto dipendente dalle caratteristiche

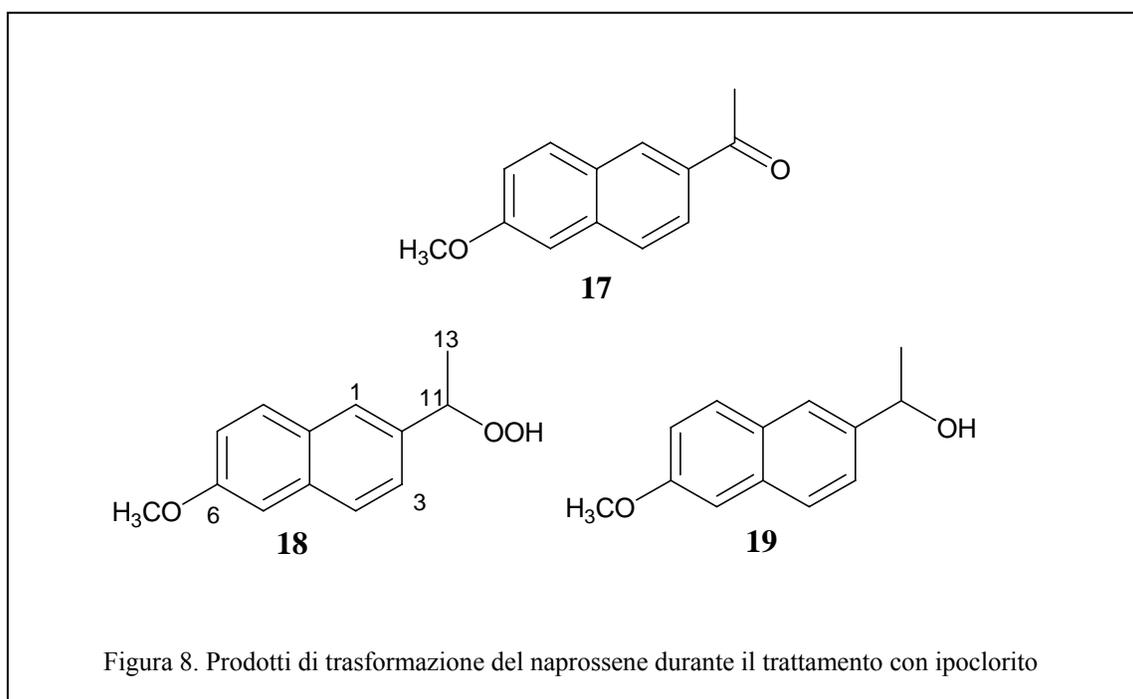
dell'acqua usata negli esperimenti. In un esperimento con rapporto molare naprossene/ipoclorito 1:16, le percentuali di rimozione del farmaco valutate a pH=5.0 e pH=7.0, sono pari rispettivamente a 99.7 e 99.2%.

### **2.3.1 Risultati e discussione**

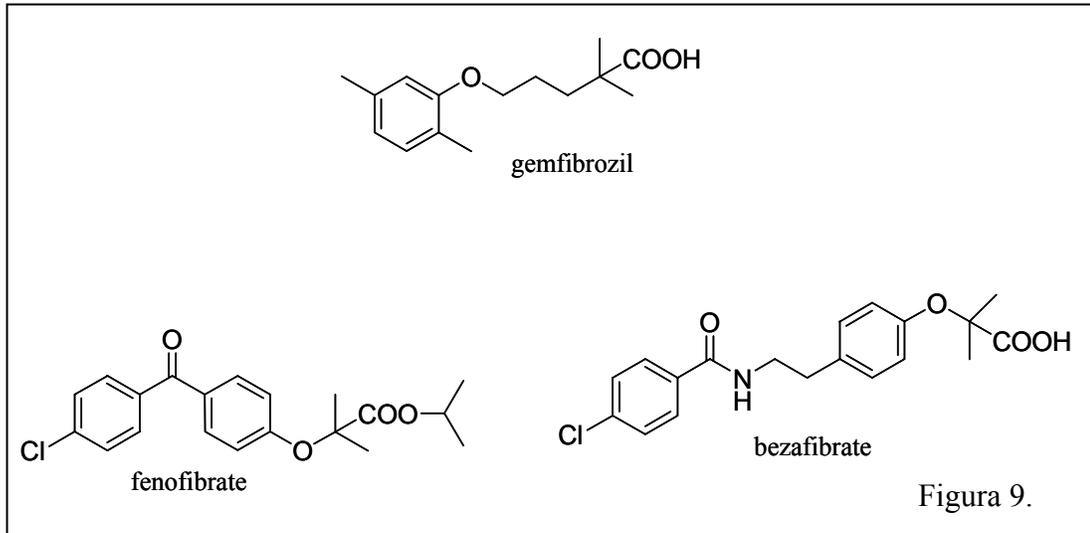
Il farmaco (Figura 7) è stato sottoposto a esperimenti di clorazione con ipoclorito di sodio che hanno confermato la sua reattività nei confronti di questo trattamento.

Nell'esperimento è stato usato un rapporto molare naprossene/ipoclorito 1:2. Dall'analisi TLC e <sup>1</sup>H NMR della miscela di reazione si evidenzia che dopo un'ora di contatto in queste condizioni, una parte del farmaco resta inalterata (62% circa). La purificazione cromatografica della miscela di reazione ha permesso di isolare tre prodotti principali **17**, **18** e **19** (Figura 8). I prodotti isolati sono stati identificati sulla base dei loro dati spettroscopici (Della Greca et al., 2004a). Questi prodotti sono stati, infatti, in precedenza descritti in letteratura (Della Greca et al., 2004a), in quanto prodotti di fototrasformazione ambientale del farmaco. Per la formazione dei prodotti s'ipotizza un meccanismo di decarbossilazione ossidativa. Dati di letteratura in cui sono riportati esperimenti condotti con altri agenti ossidanti (Bosca et al., 1992) hanno dimostrato questo tipo di reattività del naprossene. Tali dati illustrano i vari intermedi coinvolti

nel pattern di formazione dei prodotti isolati nell'esperimento con ipoclorito. Infine gli esperimenti di clorazione sono stati ripetuti al buio, fornendo gli stessi risultati, in modo da escludere che nella formazione dei prodotti siano intervenute reazioni fotochimiche.



## 2.4 Fibrati

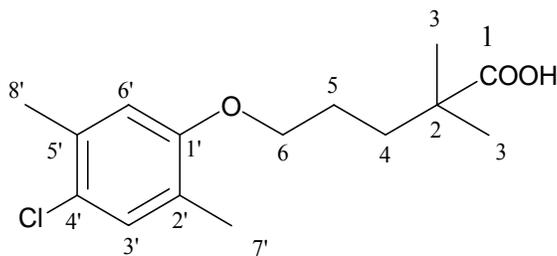


Nel corso degli ultimi 20 anni, i derivati dell'acido fibrato (etil-2-[4-clorofenossi]-2-propionato di metile) sono stati i principali farmaci utilizzati nel trattamento della iperlipidemia, causata da un aumento dei livelli di colesterolo o dei livelli di trigliceridi nel sangue (Baker R. et al., 1982; Harvengt C. et al., 1982). Il gemfibrozil ha un range di dosaggio giornaliero tra i 900 e 1200 mg/giorno. Il farmaco è escreto per circa il 70% della dose somministrata attraverso le urine principalmente come suoi coniugati o metaboliti. Il 6% del farmaco è escreto immodificato nelle urine e la stessa percentuale nelle feci. Il bezafibrato è generalmente somministrato in dosi giornaliere pari a 400 mg e dopo somministrazione orale entro 48 ore è escreto per via renale come immodificato al 50% e come coniugato al 20%. Il fenofibrato ha somministrazione giornaliera pari a 300 mg. La sua

eliminazione è essenzialmente urinaria ed entro le 24 ore è escreto all'80% come acido fenofibrico o come glucurono-coniugato. Date le elevate dosi di somministrazione la presenza di questi farmaci negli ecosistemi acquatici e negli *STP* è stata abbondantemente documentata (Ternes, 1998; Loos et al., 2007). In particolare le concentrazioni del gemfibrozil negli effluenti di *STP* italiani (Tabella 4) sono più elevate di quelle degli altri fibrati e la concentrazione maggiore (4.76 µg/L) è stata trovata nell'effluente di un *STP* di Napoli (Andreozzi et al., 2003).

#### 2.4.1 Risultati e discussione

Bezafibrato e fenofibrato si sono mostrati non reattivi nei confronti del trattamento con ipoclorito. Per il gemfibrozil, come già riportato in letteratura, il processo di clorazione può indurre trasformazione (Glassmeyer e Shoemaker, 2005). I dati bibliografici indicano che, sottoposto a reazione con ipoclorito, il gemfibrozil subisce la clorazione dell'anello aromatico. Sottoponendo il farmaco a reazione con ipoclorito è stata confermata la sua reattività nei confronti del trattamento. Dalla purificazione cromatografica della miscela derivante dall'esperimento con rapporto molare gemfibrozil/ipoclorito 1:1.9, è stato possibile isolare il prodotto **20** (4.1%).



**20**

Il prodotto **20** ha formula molecolare  $C_{15}H_{21}ClO_3$  in accordo con lo ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  285.8 con picco isotopico a  $m/z$  287.8  $[M+2+H]^+$  (33%). Nello spettro  $^{13}C$  NMR sono presenti i segnali di quattordici carboni.

Lo spettro  $^1H$  NMR presenta due singoletti a  $\delta$  7.03 (1H, H-3'), e 6.76 (1H, H-6'), indicanti la possibile sostituzione dell'anello aromatico del gemfibrozil in posizione 10. In un esperimento HMBC sono visibili le correlazioni tra il protone H-3' e i carboni C-1', C-5', C-2' e C-7', e tra il protone H-6' e i carboni C-1', C-4' e C-8'.

Inoltre nello spettro  $^1H$  NMR sono presenti un tripletto a  $\delta$  3.92 (2H,  $J= 6.5$  Hz, H-6), correlato nell'esperimento HMBC ai carboni C-1', C-5' e C-4, un singoletto a  $\delta$  2.28 (3H, H-8'), correlato ai carboni C-4', C-5' e C-6', e un altro singoletto a  $\delta$  2.12 (3H, H-7') correlato ai carboni C-1' e C-3'. Infine lo spettro  $^1H$  NMR mostra due multipletti a  $\delta$  1.78 (2H, H-5) e 1.64 (2H, H-4) e un singoletto a  $\delta$  1.15 (6H, H-3), con correlazioni HMBC con i carboni a  $\delta$  186.1 (C-1), 27.2 (C-4), 27.1 (C-3). I dati spettroscopici confermano la struttura assegnata.

Dall'analisi  $^1H$  NMR della frazione organica derivante dall'estrazione con  $CHCl_3$  (Figura 10), è possibile notare che, nell'esperimento di clorazione con rapporto molare gemfibrozil/ipoclorito 1:1.9, il farmaco e il prodotto **20** sono presenti in miscela in rapporto circa 1:1.

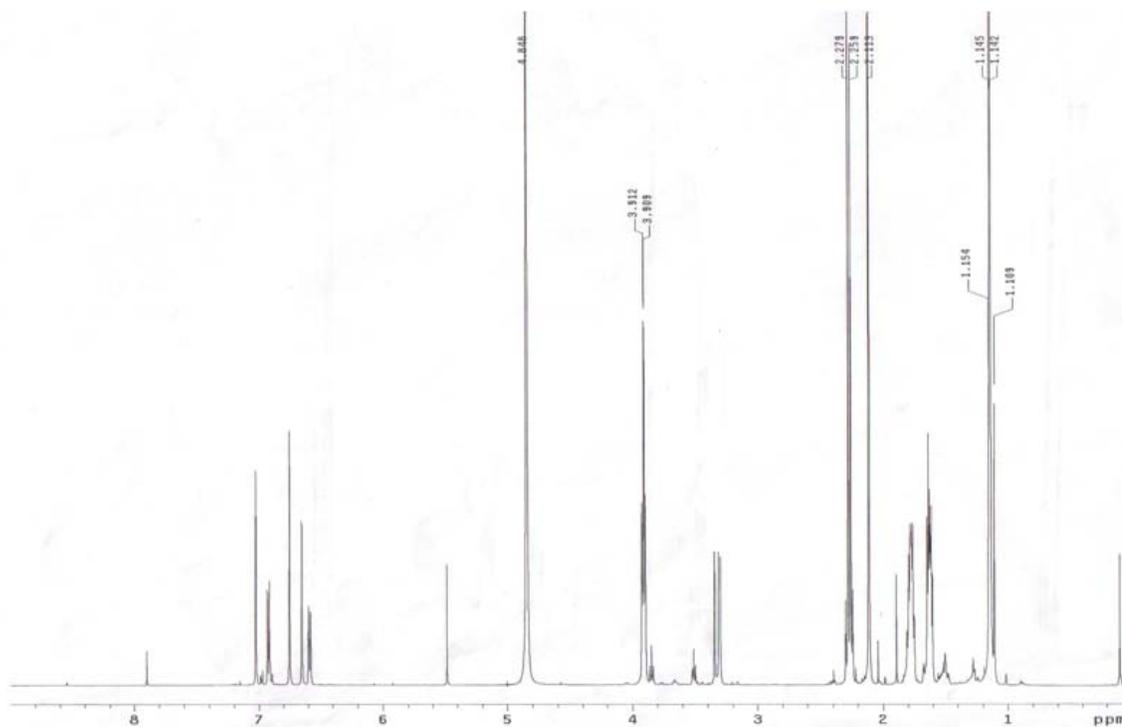
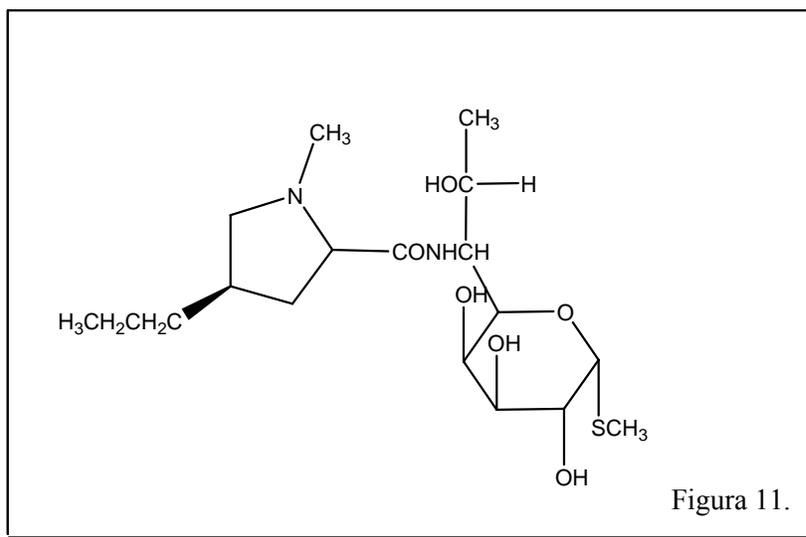


Figura 10. Spettro  $^1\text{H}$  NMR della miscela derivante dall'esperimento di clorazione con rapporto molare gemfibrozil/ipoclorito 1:1.9.

L'isolamento cromatografico da tale miscela e la valutazione delle rese [gemfibrozil (2.7%) e prodotto **20** (4.1%)] hanno permesso di confermare il dato NMR.

L'analisi  $^1\text{H}$  NMR della fase organica derivante dall'estrazione della sospensione ottenuta dall'esperimento con rapporto molare gemfibrozil/ipoclorito 1:9.5, mostra nello spettro lo stesso rapporto tra i segnali del farmaco e del prodotto **20**, indicando che, pur aumentando la concentrazione d'ipoclorito, non si hanno variazioni rispetto al precedente esperimento.

## 2.5 Lincomicina



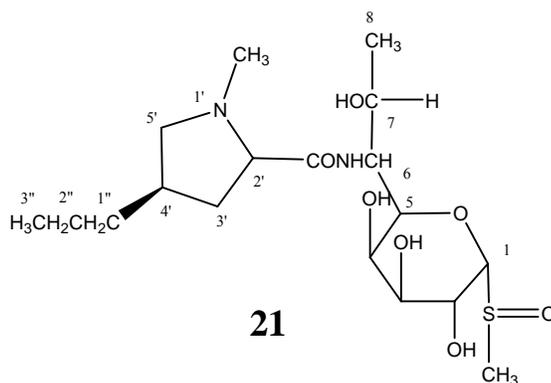
La lincomicina è un farmaco antibiotico appartenente alla famiglia delle lincosamidi. Il meccanismo d'azione è simile a quello dei macrolidi: inibizione della sintesi proteica a livello delle subunità 50 S dei ribosomi; tuttavia, il farmaco è batteriostatico o battericida dose-dipendente. Questo farmaco è particolarmente usato nella cura di faringiti, otiti, polmoniti. L'utilizzo veterinario di quest'antibiotico è considerato quantitativamente simile a quello che si verifica in medicina umana. Poiché la sua escrezione avviene per via biliare le concentrazioni ambientali ritrovate per esso, sono molto elevate rispetto a quelle attese, lasciando sospettare l'utilizzo di quantità illegali di tale farmaco in veterinaria, per scopi auxinici (come promotore di crescita). In tabella 2, sono mostrate le concentrazioni medie del farmaco, negli effluenti di *STP*, misurate in nove impianti

italiani, comparate alle concentrazioni ambientali in acque di fiume (Lambro e Po). Tali dati classificano la lincomicina come uno degli inquinanti prioritari degli ecosistemi acquatici in Italia (Zuccato *et al.*, 2005). Sono inoltre presenti dati bibliografici riguardanti gli effetti tossici indotti da miscele di farmaci, contenenti la lincomicina, alle concentrazioni ambientali, sulla crescita di cellule embrionali umane (Pomati *et al.*, 2006).

### 2.5.1 Risultati e discussione

La lincomicina (Figura 11) è stata sottoposta a reazione con ipoclorito mostrandosi molto reattiva. Nell'esperimento con rapporto molare lincomicina/ipoclorito 1:2, dopo un'ora di reazione, si ha la completa trasformazione del farmaco, come provato dall'analisi TLC e  $^1\text{H}$  NMR. La purificazione cromatografica della miscela di reazione ha permesso d'isolare il prodotto **21** (16%) e la miscela epimerica **22** (2%).

Il prodotto **21** è identificato come un prodotto di ossidazione allo zolfo della funzione tioacetaleica presente nella lincomicina.



Nello spettro MALDI del prodotto **21** è presente il segnale dello ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  423.1, in accordo con la formula molecolare  $C_{18}H_{34}N_2O_7S$ . Gli spettri  $^1H$  NMR e  $^{13}C$  NMR del prodotto **21** mostrano molte analogie con gli spettri del farmaco di partenza.

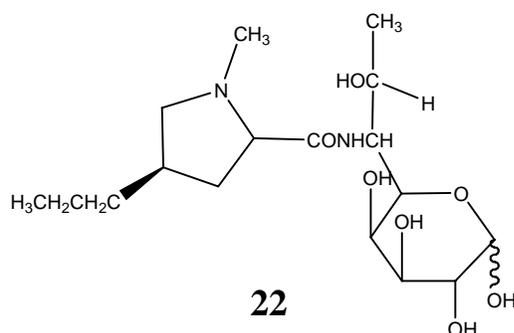
Nello spettro  $^1H$  NMR gli unici sistemi di spin che sono spostati rispetto al riferimento, sono quelli dei protoni H-1, H-2 e H-3 del galattopiranosio, il segnale di singoletto del metile legato all'atomo di zolfo e il protone H-6. Nello spettro  $^{13}C$  NMR sono presenti i segnali di diciotto carboni, attribuiti ai rispettivi protoni attraverso un esperimento HSQC (Tabella 5). In tabella 5 sono inoltre mostrate le correlazioni omonucleari ottenute in un esperimento H-H COSY.

Tutti i dati concordano con la struttura assegnata.

C	$\delta_H$	$\delta_C$	H-H COSY
1	4.60 d (6.0)	95.0	H-2
SO-CH <sub>3</sub>	2.77 s	36.5	
2	4.34 dd (10.0, 6.0)	69.0	H-1 H-3
3	4.00 m	70.4	
4	4.05 m	72.0	
5	4.41 d (8.0)	76.6	H-6
6	4.19 dd (5.5, 8.0)	56.0	H-5 H-7
7	4.04 m	68.6	H-8
8	1.25 d (6.5)	19.7	
1' N-CH <sub>3</sub>	2.45 s	41.7	
2'	3.12 dd (11.0, 8.2)	69.9	H-3'
3' <sub>a/b</sub>	1.78/2.02 m	38.4	H-4' H-2'
4'	2.20 m	38.8	H-1''
5' <sub>a/b</sub>	2.20/3.28 m	63.6	H-4'
1''	1.35 m	36.8	H-2'' H-4'
2''	1.31 m	22.6	H-1''
3''	0.93 t (6.6)	14.6	H-2''
CO		176.9	

Tabella 5. Dati NMR del composto **21**

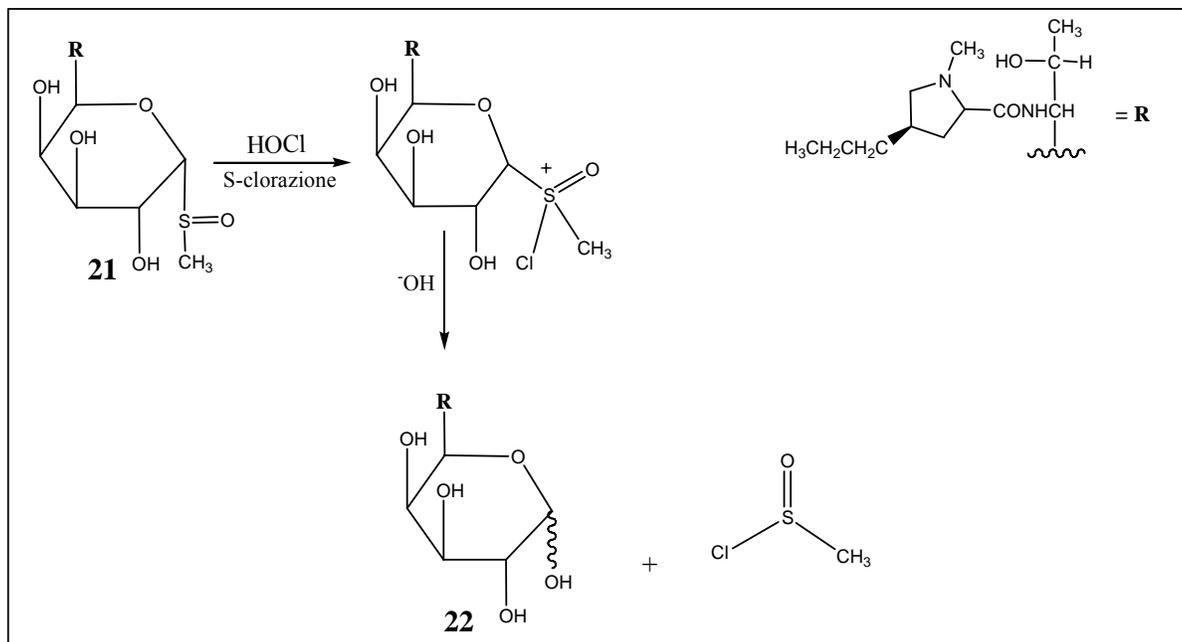
Il prodotto **22** è stato identificato come miscela di emiacetali  $\alpha$  e  $\beta$ , con formula molecolare  $C_{17}H_{32}N_2O_7$ , in accordo con il segnale dello ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  377.2, presente nello spettro MALDI.



Lo spettro  $^1H$  NMR del prodotto **22** è molto simile allo spettro del riferimento ma si evidenzia l'assenza del segnale di singoletto a  $\delta$  2.13 del metile legato all'atomo di zolfo. La presenza dei segnali di doppietto a  $\delta$  5.12 (1H, d,  $J= 3.2$  Hz) e  $\delta$  4.43 (1H, d,  $J= 7.6$  Hz), assegnati rispettivamente ai protoni anomeric  $\alpha$  e  $\beta$ , indica l'esistenza in miscela di entrambi gli anomeri. La natura di zuccheri riducenti è stata confermata dall'esito positivo ottenuto sottoponendo un'aliquota (100  $\mu$ g) di campione al saggio di Nelson-Somogyi. In tale saggio la funzione emiacetalica in equilibrio con quella aldeidica interviene in un processo di ossidoriduzione in cui il carbonile si ossida a carbossile e il catione ( $Cu^{2+}$ ) contenuto nel reattivo usato si riduce. Nel secondo step il catione metallico ritorna allo stato di ossidazione precedente per aggiunta di un cromogeno (arsenio molibdato) che invece si riduce,

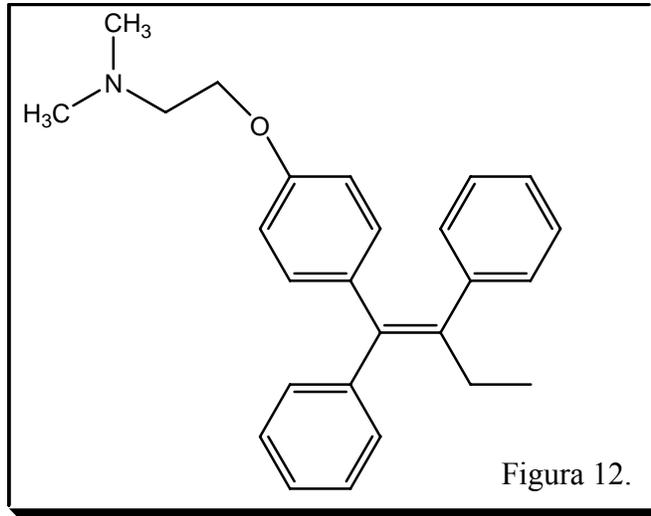
portando alla caratteristica colorazione blu, di cui è possibile misurare l'assorbanza.

La formazione del prodotto **21** è imputabile all'ossidazione dell'atomo di zolfo presente nella funzione tioacetale della lincomicina di partenza (Kowalski et *al.*, 2005). Per la formazione della funzione emiacetalica nei prodotti **22** è stata ipotizzato un intermedio di natura ionica, uno ione clorosolfossonio, generatosi a carico del prodotto **21**, attraverso un meccanismo di S-clorazione, già citato e descritto per la formazione di uno dei prodotti della ranitidina, prodotto **14**. L'evoluzione in ambiente basico di questo intermedio, come mostrato nello schema 3, porta alla formazione della funzione emiacetalica.



Schema 3. Ipotesi di formazione proposta per il prodotto **22**, derivante dalla reazione con ipoclorito della lincomicina.

## 2.6 Tamoxifen

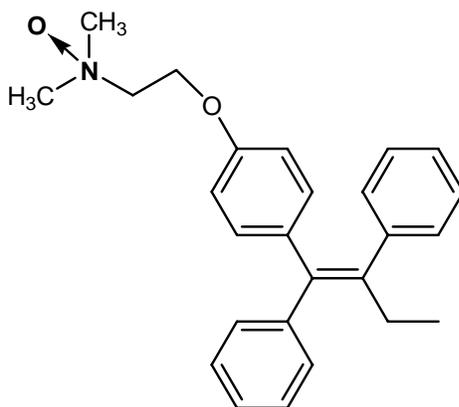


Il tamoxifen è considerato come il chemioterapico più usato nella cura del tumore al seno. L'escrezione del tamoxifen non metabolizzato avviene per via fecale. Purtroppo non esistono in questo momento in letteratura dati circa le percentuali di ritrovamento del farmaco in *STP* italiani ma è documentata però la tossicità e l'attività estrogenica degli effluenti di *STP* italiani contenenti come inquinante tale farmaco (Schilirò et al., 2004). Esistono dati bibliografici riguardanti la presenza di questo farmaco negli effluenti di *STP* (Ashton et al., 2004) e in acque superficiali (Thomas e Hilton, 2004) del Regno Unito. Sono inoltre presenti in letteratura dati circa l'attività antiestrogenica di reflui derivanti da *STP* giapponesi in cui è presente il farmaco (Sugise et al., 2006).

### 2.6.1 Risultati e discussione

Il tamoxifen (Figura 12) si è mostrato scarsamente reattivo al trattamento con ipoclorito. In tutti gli esperimenti, sia con rapporto molare tamoxifen/ipoclorito 1:2, sia in eccesso di ipoclorito (rapporto molare tamoxifen/ipoclorito 1:10), dopo un'ora di reazione, si ha che un'elevata percentuale di farmaco resta invariata, come provato dall'analisi TLC e  $^1\text{H}$  NMR. La purificazione cromatografica della miscela di reazione (rapporto molare tamoxifen/ipoclorito 1:2) ha permesso di isolare il principale prodotto **23**. Lo stesso prodotto è stato isolato anche nella miscela di reazione derivante dall'esperimento con eccesso d'ipoclorito, cioè nell'esperimento in condizioni mimiche di quelle usate durante la disinfezione dei reflui negli *STP*.

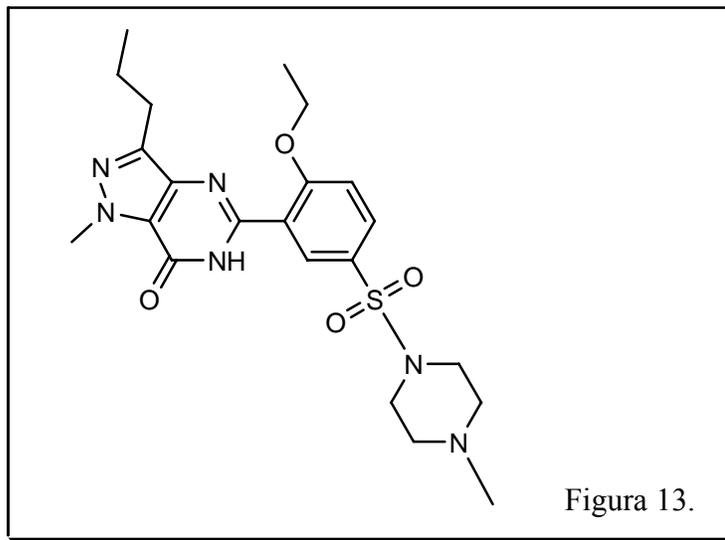
Il prodotto **23** è stato identificato come N-ossido del tamoxifen, con formula  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_2$ . L'analisi dei dati spettrali e il confronto con i dati del tamoxifen hanno permesso di attribuire la seguente struttura:



**23**

Lo spettro di massa ESI<sup>+</sup> mostra un picco a  $m/z$  388.2 imputabile allo ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$ . Nello spettro <sup>1</sup>H NMR sono presenti, nella zona a  $\delta$  7.20–6.80 i segnali dei protoni dei tre anelli aromatici, due segnali di tripletto a  $\delta$  4.21 (2H,  $J= 3.8$  Hz, CH<sub>2</sub>O) e 3.64 (2H,  $J= 3.8$  Hz, CH<sub>2</sub>N), un singoletto a  $\delta$  3.26 (6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N) e infine i segnali della catena etilica, come quartetto a  $\delta$  2.45 (2H,  $J= 7.6$  Hz) e tripletto a  $\delta$  0.92 (3H,  $J= 7.6$  Hz). Lo spettro <sup>13</sup>C NMR presenta diciassette segnali, di cui sono stati attribuiti attraverso un esperimento HSQC, i segnali a  $\delta$  70.1 (CH<sub>2</sub>N), 61.8 (CH<sub>2</sub>O) e 59.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N). La conferma della formazione dell'N-ossido del tamoxifen, è stata effettuata sintetizzando il prodotto secondo la procedura descritta in letteratura per le ammine terziarie che utilizza come reattivo una soluzione acquosa di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lewis, 1971). Dal confronto dei dati spettroscopici del composto **23** col prodotto ottenuto attraverso la sintesi è stato possibile confermare la struttura assegnata.

## 2.7 Sildenafil



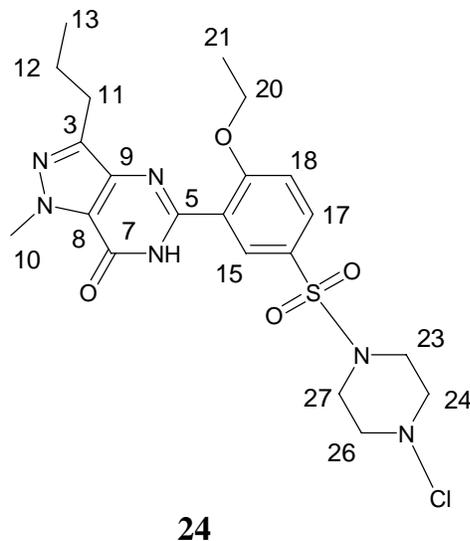
Il sildenafil, principio attivo del Viagra<sup>®</sup>, è un inibitore dell'enzima fosfodiesterasi 5 (PDE5), che converte la guanosina 3',5' monofosfato ciclica (cGMP) in guanosina 5' monofosfato (GMP), usato nel trattamento delle disfunzioni erettili. Non sono ancora presenti in letteratura dati che riferiscano il ritrovamento di questo farmaco negli effluenti degli *STP* o in acque superficiali ma attualmente è al 32° posto nella classifica americana di vendita dei farmaci su prescrizione (<http://www.rxlist.com>). Anche in Italia il sildenafil è commercializzato in grosse quantità sia attraverso le farmacie sia per vendita on-line.

### 2.7.1 Risultati e discussione

Gli esperimenti di clorazione con ipoclorito di sodio, cui è stato sottoposto il farmaco (Figura 13), hanno dimostrato la sua elevata reattività nei confronti di questo trattamento.

Sono stati eseguiti diversi esperimenti, variando il rapporto molare sildenafil/ipoclorito (1:6, 1:11, 1:18) con tempo di contatto costante (20 minuti) oppure variando il tempo di reazione (5', 20', 1h) a rapporto sildenafil/ipoclorito costante (1:11), in ciascun esperimento si ha la completa trasformazione del farmaco, come provato dall'analisi TLC e <sup>1</sup>H NMR. La purificazione cromatografica delle miscele di reazione ha permesso di isolare i tre principali prodotti **24**, **25** e **26**, presenti in tutte le miscele di reazione. Tutti i composti sono stati identificati mediante tecniche spettroscopiche.

Il composto **24** è stato identificato come un cloderivato del sildenafil con formula C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S. L'analisi dei dati spettrali e il confronto con i dati del sildenafil hanno permesso di attribuire la seguente struttura:



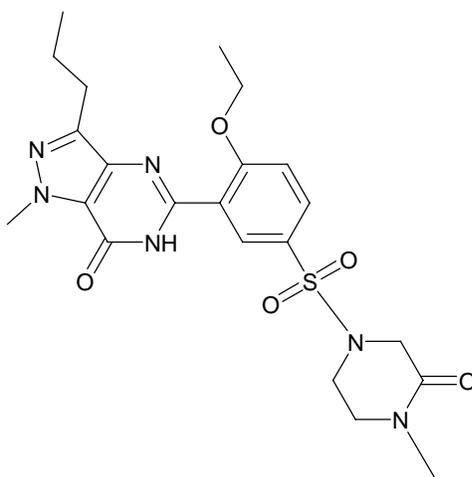
Nello spettro di massa ESI<sup>+</sup> è presente il picco dello ione pseudo molecolare [M+H]<sup>+</sup> a  $m/z$  495.0 con picco isotopico a  $m/z$  497.0 [M+2+H]<sup>+</sup> (33%).

Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR mostrano molte analogie con gli spettri del farmaco parentale. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR presenta un singoletto a  $\delta$  8.19 (1H, H-15), un doppio doppietto a  $\delta$  7.90 (1H,  $J= 9.0, 2.0$  Hz, H-17), e un doppietto a  $\delta$  7.40 (1H,  $J= 9.0$  Hz, H-18), dell'anello aromatico 1,2,4-trisostituito. Questi protoni sono correlati in un esperimento HSQC con i segnali dei carboni, rispettivamente, a  $\delta$  131.7, 133.2 e 114.3. Sono inoltre presenti i segnali a  $\delta$  4.31 (2H, q,  $J= 7.0$  Hz, H-20) e a  $\delta$  1.47 (3H, t,  $J= 7.0$  Hz, H-21), correlati nell'esperimento HSQC ai carboni, rispettivamente, a  $\delta$  66.7 e 14.7, dovuti alla catena etossilica, originariamente presente nella molecola di sildenafil. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR mostra inoltre i segnali dei sostituenti dell'anello pirazolico, il singoletto a  $\delta$  4.24 (3H, H-10) del metile

sull'N-1 e, un tripletto a  $\delta$  2.89 (2H,  $J= 7.5$  Hz, H-11), un sestupletto a  $\delta$  1.82 (2H,  $J= 7.5$  Hz, H-12) e un tripletto a  $\delta$  1.00 (3H,  $J= 7.5$  Hz, H-13) della catena propilica in posizione 3. Questi protoni sono rispettivamente correlati nell'esperienza HSQC ai carboni a  $\delta$  38.4, 28.4, 23.4 e 14.2. Infine sono presenti i segnali slargati dei metileni simmetrici dell'anello piperazinico a  $\delta$  3.22 (4H, H-24 e H-26) con correlazione HSQC al carbonio a  $\delta$  61.6 e a  $\delta$  3.31 (oscurati dal solvente, 4H, H-23 e H-27) con correlazione HSQC al carbonio a  $\delta$  47.1. Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR sono presenti i segnali di diciotto carboni.

La presenza di un cloro nello spettro di massa e l'assenza negli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR del segnale del metile in posizione 28 nella molecola del sildenafil, confermano la posizione di clorazione attribuita.

Il composto **25** ha formula molecolare  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$  in accordo con lo ione pseudo molecolare  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  489.1 nello spettro di massa  $\text{ESI}^+$ .



25

Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR sono presenti i segnali di ventidue carboni assegnati dallo spettro DEPT a quattro metili, sei metileni, tre metini e nove carboni quaternari.

Nello spettro  $^1\text{H}$  NMR sono presenti i segnali a  $\delta$  8.84 (1H, d,  $J= 2.0$  Hz, H-15), 7.88 (1H, dd,  $J= 9.0, 2.0$  Hz, H-17), 7.16 (1H, d,  $J= 9.0$  Hz, H-18), 4.39 (2H, q,  $J= 6.5$  Hz, H-20), 4.28 (3H, s, H-10), 3.72 (2H, s, H-23), 3.45 (2H, d,  $J= 5.5$  Hz, H-26), 3.42 (2H, d,  $J= 5.5$  Hz, H-27), 2.94 (3H, s, H-28), 2.94 (2H, t,  $J= 7.5$  Hz, H-11), 1.87 (2H, m, H-12), 1.65 (3H, t,  $J= 6.5$  Hz, H-21), 1.04 (3H, t,  $J= 7.5$  Hz, H-13). Attraverso un esperimento HSQC, i protoni sono stati assegnati ai rispettivi carboni. Infine la struttura è stata definita sulla base delle correlazioni presenti in un esperimento HMBC (Tabella 6).

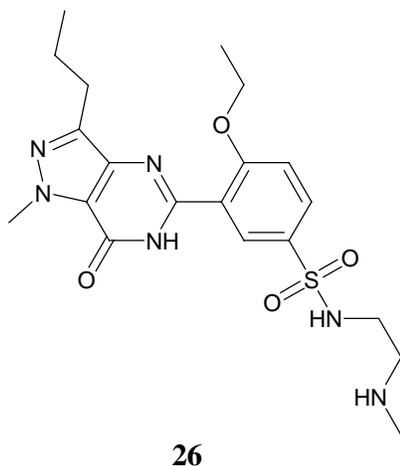
<b>C</b>	<b>DEPT</b>	$\delta_c$	$\delta_H$	<b>HMBC</b>
3	C	147.7		
5	C	146.0		
6			10.8	
7 CO	C	153.5		
8	C	124.5		
9	C	139.0		
10 N-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	38.2	4.28	C-8
11	CH <sub>2</sub>	27.7	2.94	C-3 C-9 C12 C13
12	CH <sub>2</sub>	22.2	1.87	C-3 C-11 C-13
13	CH <sub>3</sub>	14.0	1.04	C-11 C-12
14	C	121.4		
15	CH	131.1	8.84	C-5 C-17 C-19
16	C	129.0		
17	CH	131.8	7.88	C-15 C-19
18	CH	113.3	7.16	C-14 C-16 C-19
19	C	159.8		
20	CH <sub>2</sub>	66.2	4.39	C-19 C-21
21	CH <sub>3</sub>	14.5	1.65	C-20
23	CH <sub>2</sub>	48.8	3.72	C-24 C-27
24 CO	C	163.7		
26	CH <sub>2</sub>	48.2	3.45	C-24 C-28 C-27
27	CH <sub>2</sub>	43.0	3.42	C-26
28 N-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	34.1	2.94	C-24 C-26

Tabella 6. Dati NMR del composto **25**

Il composto **26** ha formula molecolare C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S in accordo con lo ione pseudo molecolare [M+H]<sup>+</sup> a *m/z* 449.1 nello spettro di massa ESI<sup>+</sup>. Nello spettro <sup>13</sup>C NMR sono presenti i segnali di diciannove carboni assegnati dallo spettro DEPT a quattro metili, quattro metileni, tre metini e otto carboni quaternari.

Nello spettro <sup>1</sup>H NMR sono presenti i segnali a  $\delta$  8.87 (1H, s, H-15), 8.00 (1H, dd, *J*= 9.0, 2.0 Hz, H-17), 7.33 (1H, d, *J*= 9.0 Hz, H-18), 4.30 (2H, q, *J*= 6.6 Hz, H-20), 4.24 (3H, s, H-10), 3.18 (2H, bt, H-23), 3.10 (2H, bt, H-24), 2.98 (2H, t, *J*= 7.5 Hz, H-11), 2.70 (3H, s, H-28), 1.80 (2H, sest, *J*= 7.5 Hz, H-12), 1.47 (3H, t, *J*= 6.6 Hz, H-21), 1.00 (3H, t, *J*= 7.5 Hz, H-13). I protoni sono stati assegnati ai rispettivi carboni attraverso un esperimento HSQC.

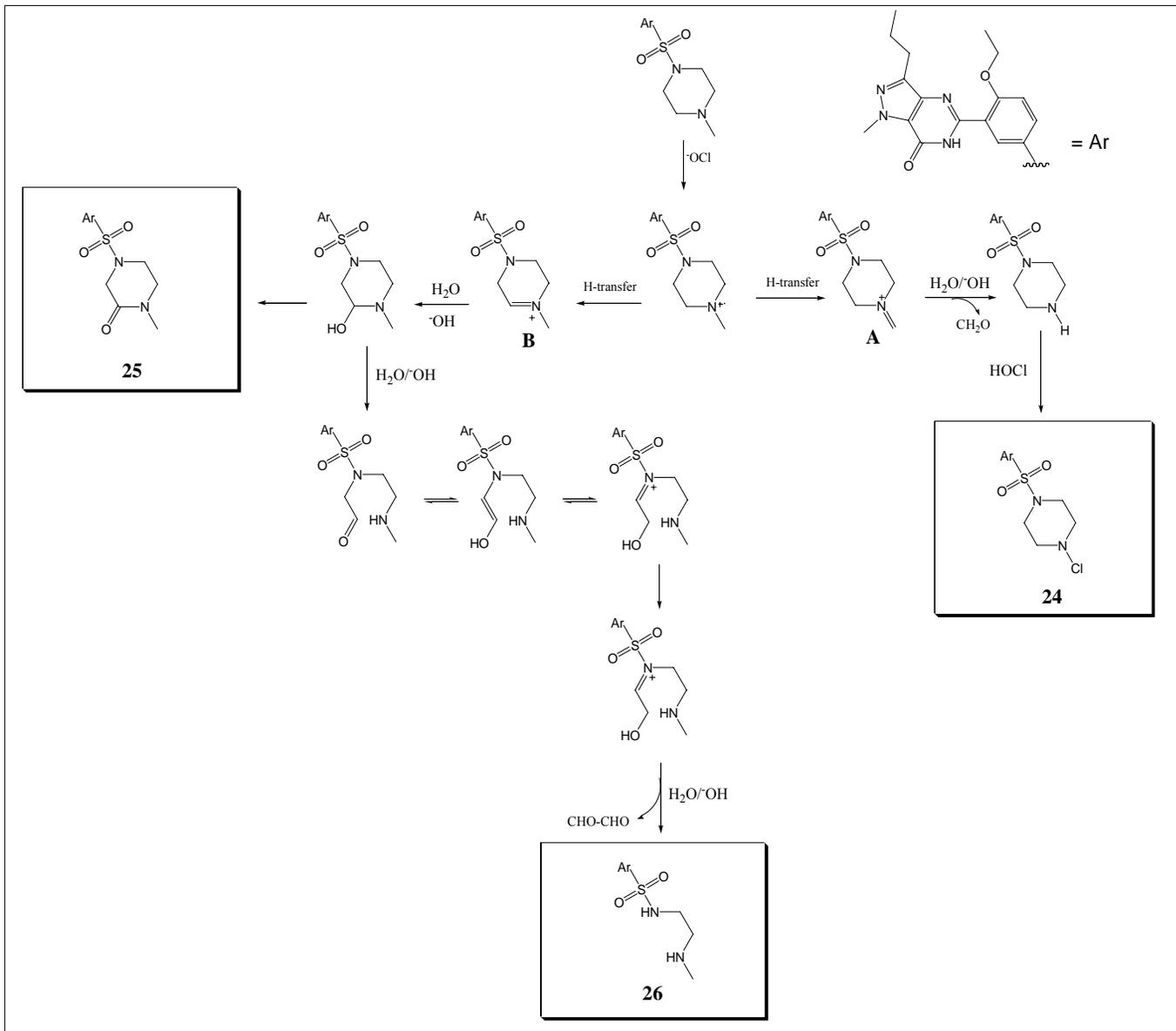
I dati spettroscopici riportati in tabella 7 concordano con la struttura assegnata:



<b>C</b>	<b>DEPT</b>	$\delta_c$	$\delta_H$	<b>HMBC</b>
3	C	147.8		
5	C	150.6		
7 CO	C	156.1		
8	C	124.8		
9	C	139.0		
10 N-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	38.9	4.24	C-8
11	CH <sub>2</sub>	28.8	2.98	C-3 C-9 C-12 C-13
12	CH <sub>2</sub>	24.0	1.80	C-3 C-11 C-13
13	CH <sub>3</sub>	14.7	1.00	C-11 C-12
14	C	124.8		
15	CH	131.5	8.27	C-5 C-17 C-19
16	C	132.1		
17	CH	133.0	8.00	C-15 C-19
18	CH	114.8	7.33	C-14 C-16
19	C	160.0		
20	CH <sub>2</sub>	67.1	4.30	C-19 C-21
21	CH <sub>3</sub>	15.2	1.47	C-20
23	CH <sub>2</sub>	41.1	3.18	
24	CH <sub>2</sub>	50.1	3.10	
28 N-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	34.0	2.70	C-24

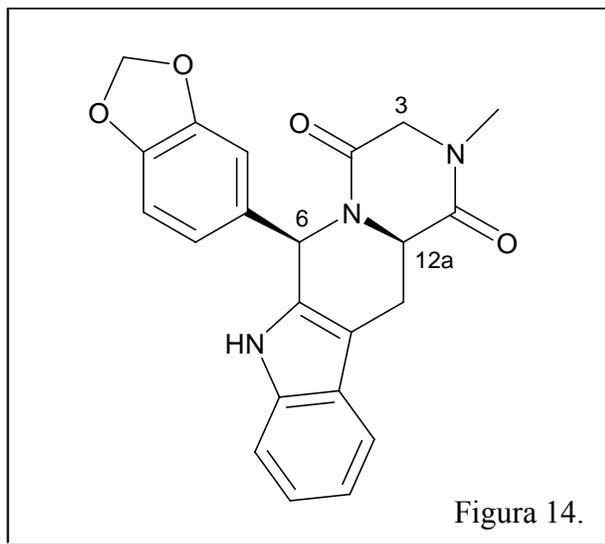
Tabella 7. Dati NMR del composto **26**

La formazione dei prodotti **24**, **25** e **26** è attribuibile all'ossidazione della funzione amminica sull'anello piperazinico (Schema 4). Il processo di ossidazione di funzioni amminiche terziarie, già evidenziato nel trattamento con ipoclorito della ranitidina, ha come step iniziale l'estrazione di un elettrone dall'atomo di azoto con formazione di un radicale catione amminico. Tale intermedio evolve velocemente per perdita di un atomo di H in posizione  $\alpha$  e formazione di uno ione imminio. Essendo presenti nella struttura due diverse posizioni  $\alpha$ , si possono generare due ioni imminio differenti **A** e **B** (Schema 4). L'idrolisi dello ione imminio **A** e la successiva clorazione della funzione amminica secondaria che deriva dall'idrolisi, portano alla formazione del prodotto **24**. Dallo ione imminio **B** si generano i prodotti **25** e **26**. In ambiente acquoso basico (pH=10), lo ione imminio evolve attraverso l'intermedio idrossilico, il quale può essere ossidato a chetone dall'ipoclorito generando il prodotto **25** o dare in ambiente basico apertura dell'anello piperazinico. Attraverso gli equilibri tautomerici e la successiva ossidazione (Schema 4), lo ione imminio **B** porta alla formazione del prodotto **26** con perdita di una molecola di gliossale.



Schema 4. Ipotesi di formazione dei prodotti 24, 25 e 26, isolati dal trattamento con ipoclorito del sildenafil.

## 2.8 Tadalafil



Il tadalafil è il principio attivo del Cialis<sup>®</sup>, utilizzato come il sildenafil, nel trattamento delle disfunzioni erettili poiché inibitore dell'enzima fosfodiesterasi 5 (PDE5), che converte la guanosina 3',5' monofosfato ciclica (cGMP) in guanosina 5' monofosfato (GMP). È in commercio dal 2003, da quando la Food and Drug Administration ne ha autorizzato la vendita. Non ci sono studi in letteratura che riferiscano del ritrovamento del tadalafil nelle acque superficiali o negli effluenti degli *STP*. In questo momento è al 65° posto nella classifica americana di vendita dei farmaci su prescrizione (<http://www.rxlist.com>). Come il sildenafil, anche il tadalafil è commercializzato in Italia in grosse quantità sia attraverso le farmacie sia per vendita on-line.

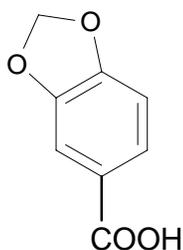
### 2.8.1 Risultati e discussione

Il farmaco (Figura 14) si è mostrato scarsamente reattivo al trattamento, trasformandosi totalmente soltanto in condizioni di fortissimi eccessi d'ipoclorito (tadalafil/ipoclorito 1:18 e 1:22) e lunghi tempi di contatto (1h).

Negli esperimenti con rapporto molare tadalafil/ipoclorito 1:7 sia dopo mezz'ora che dopo un'ora di reazione, si ha che il farmaco resta in parte inalterato, come provato dall'analisi TLC e  $^1\text{H}$  NMR. In tali condizioni si ottiene la formazione di un unico prodotto, in seguito isolato e caratterizzato come il prodotto **27**.

Negli esperimenti con forte eccesso d'ipoclorito (tadalafil/ipoclorito 1:18 e 1:22) dopo un'ora di contatto è stato possibile isolare tre prodotti **27**, **28** e **29**, e verificare inoltre la totale degradazione del farmaco di partenza. Le fasi acquose derivanti da questi esperimenti sono state estratte con  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ . Dalla purificazione su TLC della fase organica risultante, si ottiene l'isolamento dei prodotti **28** e **29**, mentre purificando su SEP-PAK in fase diretta la fase acquosa, si ottiene l'isolamento del prodotto **27**. I composti sono stati identificati sulla base dei loro dati spettroscopici.

Il prodotto **27** è stato identificato come l'acido piperonilico, comparandone i dati spettrali con i dati disponibili per il prodotto commerciale.

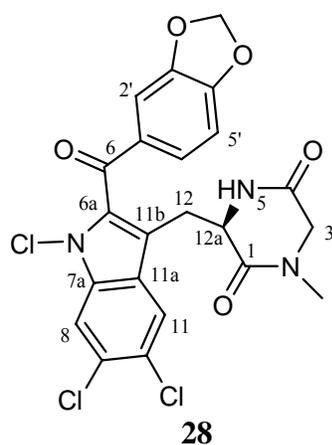


**27**

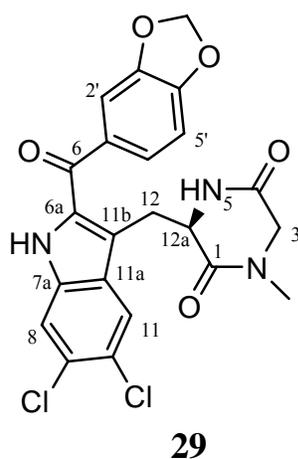
Il composto **28** ha formula  $C_{22}H_{16}Cl_3N_3O_5$  in accordo con lo ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  508.0 con picchi isotopici a  $m/z$  509.9  $[M+2+H]^+$  (96%) e a  $m/z$  511.9  $[M+4+H]^+$  (31%) nello spettro di massa ESI<sup>+</sup>. Lo spettro  $^1H$  NMR (Tabella 8) mostra i segnali di sei protoni aromatici nella zona 7.60-6.80 ppm, un protone legato ad azoto a  $\delta$  7.90, un protone metinico a  $\delta$  4.83, sei protoni metilenici a  $\delta$  6.04, 4.11, 3.94, 3.21, un metile a  $\delta$  2.96. Nello spettro  $^{13}C$  NMR sono presenti i segnali di venti carboni assegnati mediante un esperimento DEPT a dodici quaternari, sei metinici, tre metilenici e uno metilico. Attraverso un esperimento HSQC, i protoni osservati sono stati attribuiti ai corrispondenti carboni. Infine dalle correlazioni presenti in un esperimento HMBC e un H-H COSY è stato possibile attribuire la struttura assegnata.

Posizione	$\delta_H$	$\delta_C$	HMBC	H-H COSY
1		165.4 (q)		
2 (N)				
3 <sub>a</sub>	4.21 d ( $J=17.6$ Hz)	53.2 (s)	4	3b
3 <sub>b</sub>	3.88 d ( $J=17.6$ Hz)	53.2 (s)	1, 4, Me	3a
4		164.5 (q)		
5 (NH)	7.90 s			
6		191.4 (q)		
6a		129.7 (q)		
7 (N)				
7a		142.0 (q)		
8	7.31 s	123.4 (t)	7a, 9, 11a	
9		126.0 (q)		
10		116.2 (q)		
11	7.29 s	130.8 (t)	7a, 8, 9, 10, 11a	
11a		131.1 (q)		
11b		101.9 (q)		
12	3.21 d ( $J=7.3$ Hz)	44.9 (s)	1, 6a, 12a	12a
12a	4.83 t ( $J=7.3$ Hz)	58.3 (t)	4, 12	12
Me	2.96 s	33.7 (p)	1, 3	
1'		129.7 (q)		
2'	7.42 d ( $J=1.0$ Hz)	110.0 (t)	3', 4', 6', 6	
3'		148.1 (q)		
4'		152.0 (q)		
5'	6.80 d ( $J= 8.5$ Hz)	107.7 (t)	1', 3', 4'	6'
6'	7.60 dd ( $J=1.0, 8.5$ Hz)	127.0 (t)	2', 4', 6	5'
CH <sub>2</sub>	6.04 s	101.9 (s)	3', 4'	

Tabella 8. Dati NMR composto **28**



Il composto **29** ha formula  $C_{22}H_{17}Cl_2N_3O_5$  in accordo con lo ione pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  474.0 con picchi isotopici a  $m/z$  476.0  $[M+2+H]^+$  (65%) e a  $m/z$  478.0  $[M+4+H]^+$  (10%) nello spettro di massa ESI<sup>+</sup>. Gli spettri NMR del composto sono simili a quelli del composto **28**, fatta eccezione per la presenza di un ulteriore protone su azoto a  $\delta$  10.10. Dai dati ottenuti attraverso esperimenti HSQC, HMBC e NOESY (Tabella 9) è stato possibile assegnare la seguente struttura.



Posizione	$\delta_H$	$\delta_C$	HMBC	NOESY
1		165.4 (q)		
2 (N)				
3a	4.21 d ( $J=17.6$ Hz)	53.2 (s)	4	
3b	3.88 d ( $J=17.6$ Hz)	53.2 (s)	1, 4, Me	
4		164.5 (q)		
5 (NH)	7.90 s			12, 12a
6		191.4 (q)		
6a		129.7 (q)		
7 (NH)	10.08 s			
7a		142.0 (q)		
8	7.31 s	123.4 (t)	7a, 9, 11a	6'
9		126.0 (q)		
10		116.2 (q)		
11	7.29 s	130.8 (t)	7a, 8, 9, 10, 11a	12, 12a
11a		131.1 (q)		
11b		101.9 (q)		
12	3.21 d ( $J=7.3$ Hz)	44.9 (s)	1, 6a, 12a	
12a	4.83 t ( $J=7.3$ Hz)	58.3 (t)	4, 12	
Me	2.96 s	33.7 (p)	1, 3	
1'		129.7 (q)		
2'	7.42 d ( $J=1.0$ Hz)	110.0 (t)	3', 4', 6', 6	
3'		148.1 (q)		
4'		152.0 (q)		
5'	6.80 d ( $J=8.5$ Hz)	107.7 (t)	1', 3', 4'	
6'	7.60 dd ( $J=1.0, 8.5$ Hz)	127.0 (t)	2', 4', 6	
CH <sub>2</sub>	6.04 s	101.9 (s)	3', 4'	

Tabella 9. Dati NMR composto **29**

È stato dimostrato che l'idrogeno benzilico (H-6) presente nella molecola di tadalafil (Figura 14) non è un sito acido della molecola. Prove eseguite in ambiente alcalino (pH=14) conducono all'epimerizzazione alla posizione 12a (tesi di Bassolino Giovanni, anno accademico 2007/2008). Dati bibliografici riguardanti la sintesi del farmaco (Shi et al., 2008) riportano che, durante esperimenti di scambio isotopico, gli unici idrogeni coinvolti nello scambio sono quelli in posizione 3 e 12a. Tale dato supporta la non acidità ipotizzata per l'idrogeno in posizione 6. Ciò conduce a escludere meccanismi acido-base a sostegno della formazione dei prodotti. Presumibilmente, com'è stato verificato nel corso di studi fotochimici eseguiti sul farmaco, il carbonio benzilico presente nella molecola è un sito ossidabile, per cui la formazione dei prodotti di clorazione dovrebbe avvenire a seguito di processi ossidativi a carico di tale carbonio. Non essendo però noto in letteratura se anche con ipoclorito sia possibile indurre tali processi ossidativi, andrebbero eseguite altre prove a supporto dell'ipotesi meccanicistiche. Nella formazione dei composti **28** e **29** si hanno inoltre processi di clorazione sia dell'anello aromatico dell'indolo sia, nel caso del composto **28**, di N-clorazione dell'azoto indolico (De Rosa e Triana Alonso, 1978).

### 3. Test tossicologici

Sui farmaci e sui loro prodotti di clorazione sono stati eseguiti saggi di fitotossicità o, in collaborazione con il laboratorio della Dott.<sup>ssa</sup> Isidori e del Prof. Parrella, del Dipartimento di Scienze della Vita, della Seconda Università di Napoli, saggi di tossicità acuta e cronica su alcuni organismi della catena trofica acquatica, genotossicità e mutagenicità.

#### 3.1 Atenololo

L'atenololo (Figura 4), i prodotti **1**, **2**, **3** (Schema 1) e la miscela dopo 1h di clorazione (dopo evaporazione e desalificazione) sono stati sottoposti a saggi di fitotossicità, condotti su semi di *Lactuca sativa* L., specie dicotiledone, selezionata come target (Macias et al., 2000) per la sua rapida germinazione, la sua elevata sensibilità e in quanto garantisce riproducibilità delle risposte e possibilità di comparazione dei risultati dei saggi per molti composti differenti (Leather, 1983; Yu e Matsui, 1994).

I risultati dei test, espressi come percentuali d'inibizione o stimolazione rispetto al controllo, consistente nell'erbicida commerciale Pendimetalin, dimostrano che la miscela di reazione ha effetto inibente pari al 35% circa sulla germinazione (Grafico 1), a tutte le concentrazioni testate (tra  $10^{-4}$  M e  $10^{-7}$  M), mentre sono stati osservati lievi effetti sull'allungamento delle radici.

La miscela di clorazione ha invece esibito un rilevante effetto inibente sull'allungamento dell'ipocotile (Grafico 3). La riduzione è stata pari all'87% a tutte le concentrazioni testate.

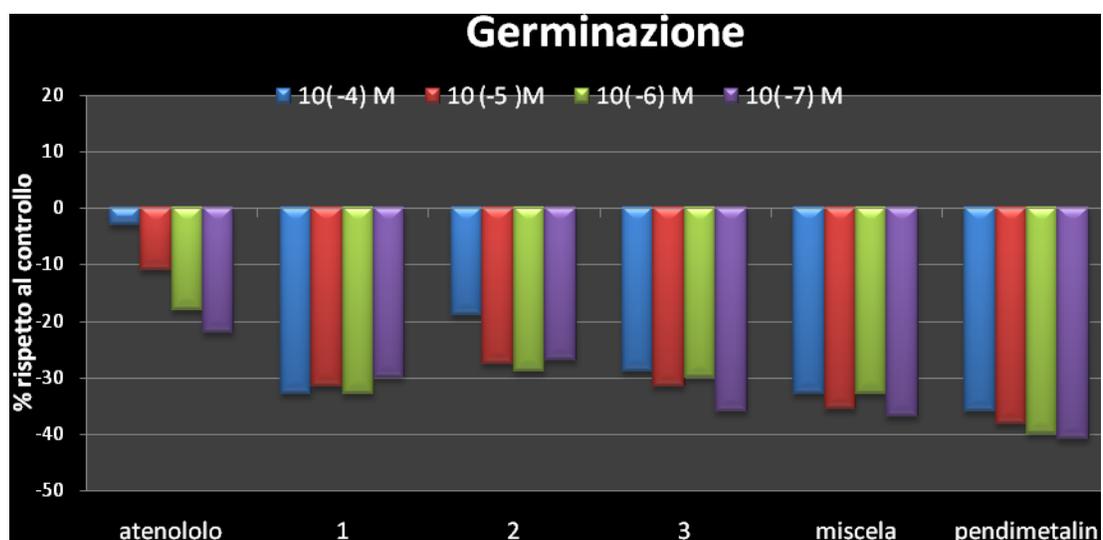


Grafico 1. Risultati dei test di fitotossicità sulla germinazione di *L. sativa*

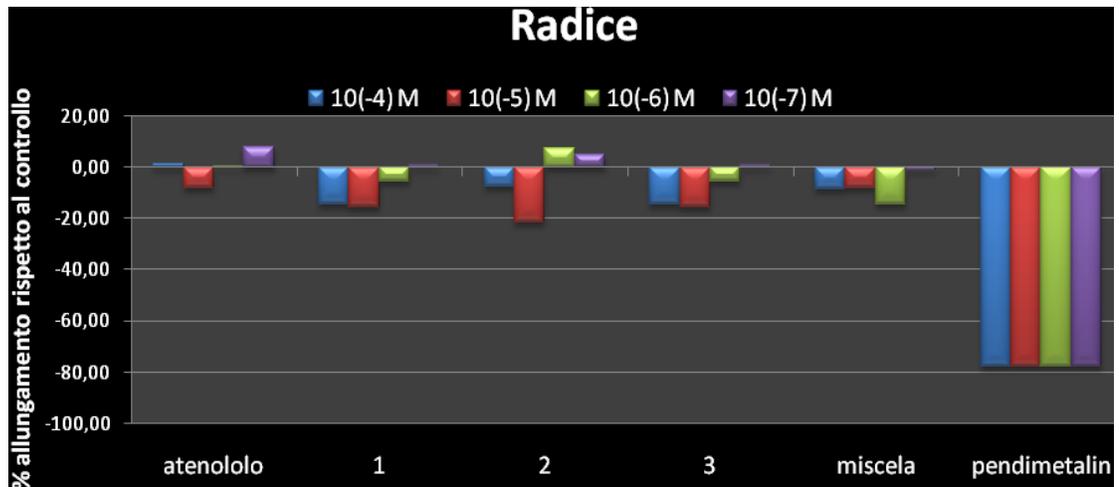


Grafico 2. Risultati dei test di fitotossicità sull'allungamento della radice di *L. sativa*

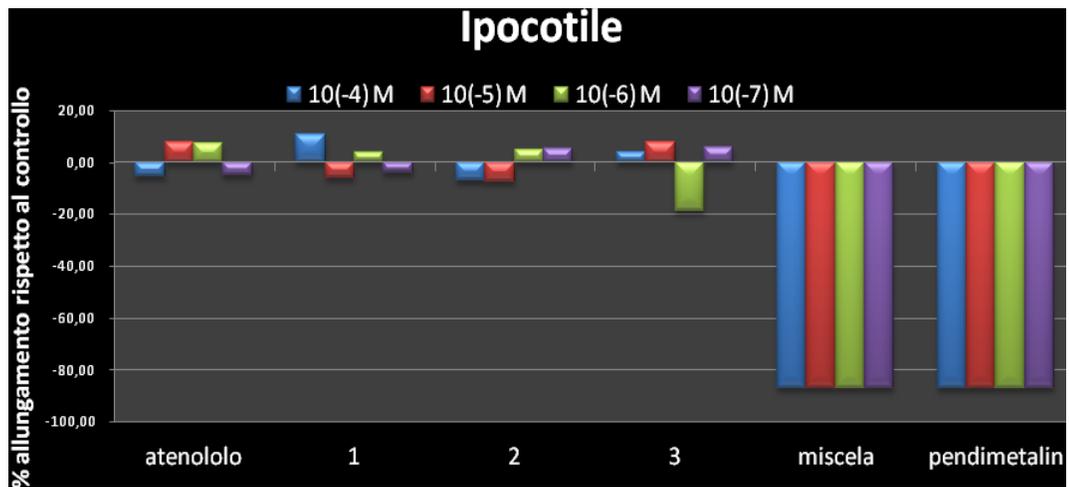


Grafico 3. Risultati dei test di fitotossicità sull'allungamento dell'ipocotile di *L. sativa*

Anche l'atenololo e i prodotti **1**, **2** e **3**, hanno un effetto inibente la germinazione. Com'è possibile notare dal grafico (Grafico1), i prodotti inducono un effetto inibente sulla germinazione dei semi maggiore di quello mostrato dal farmaco parentale, e in alcuni casi, addirittura paragonabile alla fitotossicità dell'erbicida. L'allungamento della

radice e dell'ipocotile (Grafici 2 e 3) è soltanto lievemente influenzato sia dall'atenololo sia dai prodotti, rispetto agli effetti che induce il controllo.

### **3.1.1 Discussione**

Dai risultati delle prove condotte sulla dicotiledone *Lactuca sativa* L. (cavolo di Napoli) è dimostrato che sia la miscela sia i prodotti di clorazione, hanno un effetto fortemente inibente la germinazione, paragonabile a quello manifestato da un erbicida sintetico usato come confronto e nettamente maggiore dell'effetto indotto dal farmaco parentale.

Tutti i composti hanno mostrato lievi effetti sulla crescita della radice e dell'ipocotile rispetto al controllo, mentre significativamente inibente risultata la miscela nell'allungamento dell'ipocotile, probabilmente per un effetto di sinergismo.

Il riutilizzo delle acque di scarico urbane in agricoltura, può rappresentare una valida soluzione al problema della ridotta disponibilità di acqua in molte parti del pianeta tra cui l'area mediterranea. I dati ottenuti nello studio dell'atenololo evidenziano come sia opportuno, nella prospettiva di un riutilizzo delle acque reflue per scopi agricoli, saggiare la fitotossicità sia del farmaco parentale che della miscela di clorazione e dei prodotti.

### 3.2 Ranitidina

La ranitidina (Figura 5) e i due prodotti più abbondanti, **11** e **12** (Figura 6), sono stati sottoposti a valutazioni tossicologiche. Le prime indagini effettuate sono state quelle di tossicità acuta e cronica, valutate utilizzando organismi rappresentativi, appartenenti a differenti livelli trofici acquatici.

I risultati, espressi in mg/L e mostrati in tabella 10, indicano che la ranitidina non presenta alcuna attività tossica, nei confronti del rotifero *B. calyciflorus*, e dei due tipi di crostaceo *C. dubia* e *T. platyurus*, fino alla concentrazione di 100 mg/L.

<b>Composto</b>	<b><i>B. calyciflorus</i> (LC<sub>50</sub>)</b>	<b><i>T. platyurus</i> (LC<sub>50</sub>)</b>	<b><i>C. dubia</i> (LC<sub>50</sub>)</b>
<b>Ranitidina</b>	<b>NE fino a 100</b>	<b>NE fino a 100</b>	<b>NE fino a 100</b>
<b>11</b>	<b>4.5</b> (3.5-5.9)	<b>NE fino a 25</b>	<b>6.6</b> (6.8-7.5)
<b>12</b>	<b>12.7</b> (10.6-15.5)	<b>NE fino a 25</b>	<b>2.5</b> (2.1-2.9)

Tabella 10. Valori di LC<sub>50</sub>, espressi in mg/L, con relativi limiti fiduciali, ottenuti nei saggi di tossicità acuta per la ranitidina e i suoi derivati

Il prodotto **11** presenta una tossicità a concentrazioni più basse, ma comunque lontane da quelle ambientali, con valori di LC<sub>50</sub> pari a 4.5

mg/L per *B. calyciflorus* e 6.6 mg/L per *C. dubia*, inoltre non presenta alcun effetto acuto per il crostaceo *T. platyurus*.

Il prodotto **12** mostra un valore estremamente alto di LC<sub>50</sub> per il rotifero (12.7 mg/L) ma più basso per *C. dubia* (2.5 mg/L) e nessun effetto su *T. platyurus*.

Dal confronto dei dati è evidente che i prodotti mostrano, seppure non alle concentrazioni ambientali, una tossicità maggiore rispetto al farmaco parentale.

In parallelo sono stati condotti saggi di tossicità cronica sul rotifero *B. calyciflorus* e sul crostaceo *C. dubia* i cui risultati sono riportati in tabella 11.

<b>Composto</b>	<b><i>B. calyciflorus</i> (EC<sub>50</sub>)</b>	<b><i>C. dubia</i> (EC<sub>50</sub>)</b>
<b>Ranitidina</b>	<b>2.5</b> (1.9-3.2)	<b>1.5</b> (1.1-1.9)
<b>11</b>	<b>0.8</b> (0.6-1.1)	<b>0.05</b> (0.04-0.06)
<b>12</b>	<b>0.26</b> (0.20-0.30)	<b>0.04</b> (0.03-0.05)

Tabella 11. Valori di EC<sub>50</sub>, espressi in mg/L, con relativi limiti fiduciali, ottenuti nei saggi di tossicità cronica per la ranitidina e i suoi derivati.

La ranitidina mostra un valore di EC<sub>50</sub> di 2.5 mg/L per il rotifero e di 1.5 mg/L per il crostaceo. I prodotti presentano valori concretamente più bassi, dell'ordine dei µg/L, dimostrando un'attività tossica a lungo termine maggiore rispetto al composto parentale. In particolare nel

caso di *C. dubia* i valori di EC<sub>50</sub> per i prodotti **11** e **12** sono di due ordini di grandezza inferiori rispetto ai valori ottenuti nei saggi acuti. Questi dati evidenziano un notevole potenziale tossico dei prodotti poiché indicano una spiccata inibizione nella riproduzione degli organismi testati.

I risultati del test di mutagenesi (Ames) sono riportati in tabella 12. La ranitidina, alle concentrazioni testate, è fortemente mutagena per TA98 con un RM (rapporto di mutagenicità) pari a 8.1; il prodotto **11**, testato nel medesimo intervallo di concentrazione per entrambi i ceppi, ha mostrato attività nei confronti sia di TA98 che di TA100 con lo stesso RM (3.2); mentre il composto **12** non ha rilevato alcuna azione nei confronti di entrambi i ceppi.

COMPOSTO	TEST DI AMES					
	TA98			TA100		
	Intervallo di concentrazione mutagenica (µg/ml)	Revertenti/µg	RM Max	Intervallo di concentrazione mutagenica (µg/ml)	Revertenti/µg	RM Max
<b>Ranitidina</b>	50-100	28 ± 7	8.1 ± 0.9	nm	ns	1.3 ± 0.4
<b>11</b>	0.31-0.62	2160 ± 640	3.2 ± 0.3	0.31-0.62	876 ± 103	3.2 ± 0.5
<b>12</b>	0.25-1.27	ns	1.3 ± 0.4	0.25-1.27	ns	1.7 ± 0.3

Tabella 12. Risultati dei test di mutagenicità  
 nm = nessun effetto mutagenico dimostrato;  
 ns = numero di revertenti non significativo rispetto al controllo;  
 RM (rapporto di mutagenicità) = numero di revertenti/piastra rispetto al controllo

Nel saggio di genotossicità (Tabella 13) la ranitidina e il prodotto **12** si sono dimostrati genotossici alle più alte concentrazioni testate (ranitidina=12.5-25 µg/ml; prodotto **12**= 2.5-5 µg/ml); al contrario il prodotto **11** ha mostrato una maggiore capacità di danneggiare il DNA del batterio *E. coli* alla più bassa concentrazione saggiata con un I.F. di 3.6.

SOS CHROMOTEST		
Composto	Intervallo di concentrazione genotossica (µg/ml)	I.F.
Ranitidina	12.5-25	2.3±0.3
<b>11</b>	<b>0.312-5</b>	<b>3.6±0.6</b>
<b>12</b>	<b>2.5-5</b>	<b>2.1±0.3</b>

Tabella 13. Risultati dei test di genotossicità  
I.F = fattore d'induzione.

### 3.2.1 Discussione

Alla luce dei dati di tossicità riportati, si può concludere che è molto improbabile che residui di questo farmaco possano determinare effetti di tossicità acuta per l'ecosistema acquatico. I risultati di tossicità acuta rappresentano però la base per l'esecuzione di altri test, per i quali la scelta dei valori di concentrazione da saggiare, si basa proprio sui dati ottenuti dai test acuti. Nel determinare l'impatto di un farmaco sulla catena trofica acquatica, i test cronici si dimostrano più

appropriati di quelli acuti, poiché contribuiscono a fornire informazioni sugli effetti, seppur impercettibili, ma che si accumulano nel tempo. In particolare il test a sette giorni su *C. dubia* è il più adatto per questo tipo di farmaco.

La ranitidina si è dimostrata un farmaco poco attivo in questi due tipi di test ma conducendo delle indagini di mutagenicità e genotossicità, essa ha riportato un effetto sia genotossico sia mutagenico, con una buona correlazione dose/risposta.

In conformità a queste considerazioni e alla luce di questi risultati si rivela che le valutazioni tossicologiche di screening, basate sui test di tossicità acuta, poco si adattano a registrare gli effetti di danno per questo genere di sostanze, presenti in concentrazioni dell'ordine dei (ng-µg)/L e devono essere considerate secondarie nella valutazione del potenziale tossico di un farmaco.

I risultati delle indagini tossicologiche eseguite sui prodotti hanno evidenziato la possibilità che il trattamento con ipoclorito possa indurre la formazione di derivati potenzialmente più pericolosi del farmaco parentale. Essi, infatti, oltre a mostrare valori di concentrazioni attive più bassi nei test acuti, si sono dimostrati piuttosto attivi nei test cronici, in particolare *C.dubia*, comprovando la maggiore attendibilità di questo test, e si sono rivelati dannosi per il DNA, in particolare il prodotto **11**.

Le rese molari dei prodotti in condizioni di eccesso d'ipoclorito (42% prodotto **11** e 46 % prodotto **12**) e la loro velocità di formazione (2 minuti di contatto, [ranitidina]:[NaOCl]=1:2), lasciano supporre che le loro concentrazioni ambientali possano essere significative. Il rischio

ambientale derivante dalla loro possibile immissione attraverso gli impianti di depurazione non deve quindi essere sottovalutato.

### 3.3 Naprossene

I dati di tossicità acuta e cronica del farmaco (Figura 7) e dei prodotti **17** e **19** (Figura 8), isolati dagli esperimenti di clorazione, sono stati precedentemente riportati per i prodotti derivanti dalla degradazione fotochimica del farmaco (Della Greca et al., 2004a; Isidori et al., 2005). Non sono noti i dati per il composto **18** a causa della sua elevata instabilità. Sono presenti i dati di tossicità acuta oltre che per gli organismi selezionati nelle valutazioni di tossicità della ranitidina (*B. calyciflorus*, *T. platyurus* e *C. dubia*) anche su altri due organismi acquatici il crostaceo *Daphnia magna*, appartenente allo stesso ordine di *C. dubia*, e *Vibrio fischeri*, batterio gram-negativo bioluminescente in grado di emettere luce spontaneamente in condizioni ottimali. La presenza di sostanze inibenti si manifesta mediante una riduzione della bioluminescenza proporzionale alla tossicità del campione in esame. La semplicità metodologica e la riproducibilità del test, rende questo microrganismo particolarmente adatto per il monitoraggio di effetti ambientali immediati. I dati mostrati in tabella 14, evidenziano che i prodotti sono più tossici del composto parentale.

Composto	<i>V. fischeri</i>	<i>B. calyciflorus</i>	<i>T. platyurus</i>	<i>C. dubia</i>	<i>D. magna</i>
<b>Naprossene</b>	<b>42.95</b>	<b>54.64</b>	<b>43.54</b>	<b>43.64</b>	<b>59.44</b>
	<b>(38.01-53.11)</b>	<b>(35.9-83.1)</b>	<b>(35.35-53.62)</b>	<b>(34.64-54.96)</b>	<b>(44.14-80.04)</b>
<b>17</b>	<b>16.17</b>	<b>9.45</b>	<b>8.23</b>	<b>16.70</b>	<b>13.65</b>
	<b>(14.68-17.82)</b>	<b>(8.06-11.07)</b>	<b>(7.21-9.39)</b>	<b>(13.55-20.58)</b>	<b>(10.08-18.63)</b>
<b>19</b>	<b>20.61</b>	<b>14.46</b>	<b>14.01</b>	<b>16.49</b>	<b>12.61</b>
	<b>(19.49-21.81)</b>	<b>(11.5-18.19)</b>	<b>(11.7-16.77)</b>	<b>(10.20-26.44)</b>	<b>(6.87-23.15)</b>

Tabella 14. Valori di L(E)C<sub>50</sub> (mg/L), con relativi limiti fiduciali, riportati nei saggi di tossicità acuta per il naprossene e i suoi derivati (Isidori et al., 2005).

I dati di tossicità cronica per il naprossene e i prodotti **17** e **19** sono riportati per gli stessi organismi usati nei test della ranitidina, il rotifero *B. calyciflorus* e il crostaceo *C. dubia*, inoltre sono presenti i dati di tossicità del test d'inibizione algale su *Pseudokirchneriella subcapitata* (normalmente nota come *Selenastrum capricornutum*), in cui la misura della densità algale (mediante lettura dell'assorbanza a 663 nm, secondo il protocollo standard ISO/DIS 8692) dopo 72 ore d'incubazione garantisce un metodo di valutazione veloce degli effetti di una sostanza. Dalle valutazioni di tossicità cronica emerge che l'alga non è particolarmente sensibile al naprossene mentre i prodotti sono bioattivi a concentrazioni inferiori. Infine è possibile notare dalla tabella 15 che, per tutti i composti saggiati, le concentrazioni bioattive sugli altri organismi test, che rappresentano i consumatori primari della catena trofica acquatica, sono nettamente inferiori.

Composto	<i>P. subcapitata</i>	<i>B. calyciflorus</i>	<i>C. dubia</i>
<b>Naprossene</b>	39.31 (33.16-46.61)	0.79 (0.64-0.89)	0.68 (0.39-1.32)
<b>17</b>	3.86 (2.93-5.08)	0.46 (0.10-0.95)	0.10 (0.07-0.16)
<b>19</b>	6.86 (5.05-9.31)	0.25 (0.14-0.35)	1.06 (0.46-2.65)

Tabella 15. Valori di EC<sub>50</sub> (mg/L), con relativi limiti fiduciali, riportati nei saggi di tossicità cronica per il naprossene e i suoi derivati (Isidori et al., 2005).

### 3.3.1 Discussione

Il naprossene si è dimostrato sensibile al trattamento con ipoclorito. I dati di tossicità indicano che l'esposizione degli organismi acquatici al farmaco e ai suoi prodotti ha effetti a concentrazioni dell'ordine dei mg/L. Tali concentrazioni non rappresentano i valori di concentrazione ambientale attesi, per cui tali dati preliminari di tossicità escludono la possibilità che il farmaco e i suoi prodotti possano rappresentare un rischio per l'ambiente e la salute umana.

### 3.4 Gemfibrozil

I dati di tossicità per il gemfibrozil (Figura 9) sono abbondantemente riportati in letteratura, dimostrando la sua elevata tossicità (Mimeault et al., 2005; Rosal et al., 2009; Isidori et al., 2007; Zurita et al., 2007). Alla luce di questi dati risulta opportuno, per uno screening completo sul rischio ambientale posto da questo farmaco, sottoporre il prodotto di clorazione alle valutazioni tossicologiche necessarie. La scarsa quantità di prodotto **20** recuperata, non ha finora reso possibile sottoporlo alle valutazioni tossicologiche.

### 3.5 Sildenafil

Il sildenafil (Figura 13) e il prodotto più abbondante, **24** (Schema 4), sono stati sottoposti a valutazioni tossicologiche. Le prime indagini effettuate sono state quelle di tossicità acuta e cronica, valutate utilizzando organismi rappresentativi, appartenenti a differenti livelli trofici acquatici.

I risultati, espressi in mg/L e mostrati in tabella 16, indicano che il sildenafil presenta attività tossica nei confronti degli organismi acquatici selezionati a concentrazioni piuttosto elevate tranne che nel caso del crostaceo *C. dubia* (5.74 mg/L).

Il composto **24** mostra un effetto tossico simile al farmaco parentale sul crostaceo *T. platyurus*, mentre risulta tossico a concentrazioni inferiori rispetto al sildenafil sul rotifero *B. calyciflorus* (Tabella 16).

Composto	<i>B. calyciflorus</i> (LC50)	<i>T. platyurus</i> (LC50)	<i>C. dubia</i> (LC50)	<i>D. magna</i> (EC50)
Sildenafil	70.71 (65.16-82.14)	42.74 (34.32-53.21)	5.74 (3.08-10.71)	30.78 (24.28-39.01)
24	19.82 (17.51-22.43)	51.68 (44.24-60.37)	-	-

Tabella 16. Valori di L(E)C<sub>50</sub> (mg/L), con relativi limiti fiduciali per p=0.05, ottenuti nei saggi di tossicità acuta per il sildenafil ed il prodotto **24**.

Nei test di tossicità cronica il sildenafil ha mostrato un'attività tossica a elevate concentrazioni nel test algale mentre le concentrazioni attive nei test col crostaceo *C. dubia* e col rotifero *B. calyciflorus* sono nettamente inferiori, come mostrato in tabella 17.

Composto	<i>P. subcapitata</i> (EC50)	<i>B. calyciflorus</i> (EC50)	<i>C. dubia</i> (EC50)
Sildenafil	91.36 (70.15-118.96)	2.48 (2.10-2.9)	0.64 (0.52-0.79)
24	3.86 (2.93-5.08)	NE (5ppm)	-

Tabella 17. Valori di EC<sub>50</sub> (mg/L), con relativi limiti fiduciali, per p=0.05, ottenuti nei saggi di tossicità cronica per il sildenafil e il suo derivato **24**.

NE: nessun effetto

I risultati del test di mutagenesi (Ames), riportati in tabella 18 mostrano che, il sildenafil, alle concentrazioni testate, è mediamente mutageno per TA98 con un RM (rapporto di mutagenicità) pari a 3.58 ma non ha effetti sul ceppo TA100

TEST DI AMES						
	TA98			TA100		
	Intervallo di concentrazione mutagenica (µg/ml)	Revertenti/µg	R.M Max	Intervallo di concentrazione mutagenica (µg/ml)	Revertenti/µg	RM Max
<b>Sildenafil</b>	0.625-10	3.58 ± 0.3	4.49 ± 0.5	-	nm	1.37 ± 1.5

Tabella 18. Risultati dei test di mutagenicità  
 nm = nessun effetto mutagenico dimostrato;  
 RM (rapporto di mutagenicità) = numero di revertenti/piastra rispetto al controllo

Nel saggio di genotossicità (Tabella 19) il sildenafil si è dimostrato genotossico mostrando una capacità di danneggiare il DNA del batterio *E. coli* alla più bassa concentrazione saggiata con un I.F. di 2.45.

SOS CHROMOTEST			
Composto	Intervallo di concentrazione genotossica (µg/ml)	I.F. Max	R <sup>2</sup>
<b>Sildenafil</b>	<b>1.25-50</b>	<b>2.45 ± 0.60</b>	<b>0.68</b>

Tabella 19. Risultati dei test di genotossicità  
 I.F. = fattore d'induzione.

## Conclusioni

Nel presente progetto di dottorato è stato esaminato il comportamento di alcuni farmaci al trattamento con ipoclorito in condizioni mimiche di quelle usate per la clorazione dei reflui durante la fase di sterilizzazione negli impianti *STP*.

La selezione dei farmaci si è basata sulla presenza nella loro struttura molecolare di gruppi potenzialmente reattivi, sul loro carico ambientale e sui dati bibliografici riguardanti il loro ritrovamento negli effluenti *STP* e nelle acque superficiali.

I farmaci studiati sono stati: atenololo, ranitidina, naprossene, gemfibrozil, benzafibrato, fenofibrato, tamoxifen, lincomicina, sildenafil e tadalafil.

- L'atenololo si è dimostrato molto reattivo nei confronti del trattamento con ipoclorito, degradandosi totalmente in tutti gli esperimenti di clorazione e portando alla formazione di quattro prodotti. La formazione dei prodotti può giustificarsi con un processo primario di N-clorazione della funzione amminica secondaria presente nel farmaco seguito da fasi di degradazioni successive.
- La ranitidina ha esibito un'elevata reattività trasformandosi già dopo solo due minuti di contatto anche a basse concentrazioni

d'ipoclorito. Nelle condizioni di eccesso il farmaco si degrada totalmente con formazione di quattro prodotti. La formazione dei prodotti avviene per processi di ossidazione della funzione sulfurea e reazioni di N-clorazione dei gruppi amminici secondari presenti nel farmaco. Si sono poi ipotizzate reazioni di ossidazione della funzione amminica terziaria e di S-clorazione.

- Il naprossene per trattamento con ipoclorito dà luogo alla formazione di tre prodotti. Una decarbossilazione ossidativa può giustificare la formazione nelle condizioni di eccesso mimiche di quelle d'impianto.
- Dei tre fibrati studiati, benzafibrato, fenofibrato e gemfibrozil, soltanto il gemfibrozil si è mostrato reattivo nei confronti del processo portando alla formazione di un unico prodotto, ottenuto per clorazione dell'anello aromatico. Il farmaco si degrada quasi completamente a tutte le concentrazioni d'ipoclorito usate negli esperimenti.
- La lincomicina ha esibito un'elevata reattività degradandosi totalmente anche a basse dosi d'ipoclorito, con formazione di un prodotto di ossidazione allo zolfo e una miscela di emiacetali. La loro formazione è stata giustificata con un processo di S-clorazione e successiva rottura dell'intermedio generato.
- Il tamoxifen si è mostrato piuttosto recalcitrante al trattamento, anche per lunghi tempi di contatto ed elevate dosi d'ipoclorito.

Nel trattamento si ha formazione di un unico prodotto di ossidazione all'azoto amminico terziario.

- Il sildenafil, sottoposto al trattamento con ipoclorito si è mostrato altamente reattivo degradandosi totalmente in tutti gli esperimenti di clorazione anche in tempi brevi (5') e portando alla formazione di tre prodotti, tutti giustificabili sulla base del meccanismo di ossidazione della funzione amminica terziaria presente nell'anello piperazinico.
- Il tadalafil si trasforma totalmente soltanto spingendo le condizioni di reazione verso fortissimi eccessi d'ipoclorito (farmaco/ipoclorito 1:18 e 1:22) e lunghi tempi di contatto (1h). La clorazione porta alla formazione di tre prodotti, in cui si è avuta rottura del legame tra l'azoto e il carbonio benzilico. Si sono inoltre verificati processi di N-clorazione dell'azoto indolico e di clorazione dell'anello aromatico.

Sulla base dei dati raccolti è stato possibile evidenziare che i farmaci studiati possono reagire con NaOCl nelle vasche di disinfezione portando alla formazione di metaboliti ambientali che si sono dimostrati stabili nelle condizioni d'isolamento e di caratterizzazione. È stato evidenziato un chimismo generale per quei farmaci che hanno funzioni amminiche primarie e secondarie e funzioni solfuro. Nel caso dei gruppi amminici primari e secondari si ha sempre N-clorazione, e nel caso delle funzioni solfuro, si ha sempre ossidazione a solfossido.

Non è stato possibile generalizzare il comportamento di farmaci con una funzione carbossilica: il naprossene, infatti, decarbossila mentre i fibrati non subiscono alcuna trasformazione di tale funzione.

Anche nel caso di gruppi amminici terziari la reattività è variabile. Infatti mentre nella molecola del tamoxifen si forma un N-ossido stabile, nel caso della ranitidina e del sildenafil il processo di ossidazione ha portato alla formazione di diversi composti attraverso l'evoluzione di intermedi cationi imminici. L'estensione dello studio ad altri farmaci si rende pertanto utile per cercare di comprendere la relazione fra la reattività di questi gruppi funzionali e l'intorno chimico presente in queste molecole.

La valutazione del rischio ambientale posto dai farmaci comprende lo studio della tossicità del farmaco e di tutti i suoi metaboliti, biologici e ambientali. Pur essendo le concentrazioni ambientali dei farmaci dell'ordine dei (ng - µg)/L, ossia valori non capaci di esercitare effetti tossici acuti sull'uomo e sugli altri organismi viventi, non deve essere sottovalutato il rischio connesso ad un'esposizione continua. Gli effetti tossici dipendono da diversi fattori: dose, durata dell'esposizione, via di somministrazione, caratteristiche dell'organismo esposto (Fent et al., 2006, Jjemba, 2006). Farmaci e metaboliti sono quindi potenzialmente in grado di contaminare l'ambiente per fenomeni di accumulo locale e bioaccumulo in specie vegetali e animali dell'ambiente acquatico (Coogan et al., 2006) e, per biomagnificazione

lungo la catena trofica, possono raggiungere gli animali superiori e l'uomo (Gray, 2002).

Pertanto il potenziale impatto ambientale dei farmaci e dei loro prodotti è stato valutato eseguendo saggi di fitotossicità oppure, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Vita, della Seconda Università di Napoli, saggi di tossicità acuta e cronica, su diversi organismi acquatici, genotossicità e mutagenicità. Questa combinazione di studi è poco frequente in letteratura ma negli ultimi anni sta divenendo di particolare interesse nell'ambito della Chimica dell'Ambiente.

Le miscele di clorazione e i prodotti sottoposti a saggi di fitotossicità, condotti in accordo alla procedura ottimizzata da Macias *et al.*, 2000, sulla dicotiledone *Lactuca sativa* L. (cavolo di Napoli) hanno mostrato un effetto inibente la germinazione e la crescita dell'ipocotile, come nel caso dell'atenololo.

Nel caso della ranitidina e dei suoi prodotti la valutazione su alcune specie della catena trofica acquatica (tossicità acuta e cronica) ha dimostrato che i prodotti sono più tossici del farmaco parentale e i risultati dei test di mutagenicità e genotossicità hanno dimostrato che il farmaco è mutagenico e genotossico a concentrazioni elevate mentre i prodotti sono in grado di indurre una risposta positiva a concentrazioni molto più basse.

Tutti i dati di tossicità raccolti, seppur preliminari, suggeriscono che, prima di pensare ad un possibile riuso dei reflui derivanti da impianti

*STP*, sia per irrigazione in agricoltura sia per il consumo umano attraverso cicli di potabilizzazione, è necessario verificare la qualità di tali acque e immaginare processi in grado di abbattere, ove presenti, tali tipi di inquinanti.

## **5. Parte Sperimentale**

### **Materiali e metodi**

**Spettrometria di massa:** Gli spettri MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) sono stati registrati su uno spettrometro di massa Voyager-DE PRO MALDI-TOF, caricando i campioni su matrice di acido 2,5- diidrossibenzoico (DHB).

Gli spettri EI-MS (Electron- Impact Mass Spectrometry) sono stati ottenuti operando a 70 eV su uno strumento Shimadzu GC-MS QP-5050A.

Gli spettri ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) sono stati eseguiti in modalità elettrospray ioni positivi (ESI+) utilizzando uno strumento LC/MSD Agilent 1100 VL nelle seguenti condizioni: pressione del nebulizzatore 50 psi; drying gas azoto flussato a 12 L/min a una temperatura di 350 °C; voltaggio del capillare all'ingresso 4000 V; voltaggio del frammentatore nell'intervallo tra 80 e 30 V.

**Spettroscopia NMR:** Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) sono stati registrati su uno spettrometro NMR Varian 500 Unity Inova a trasformata di Fourier, operante a 499.6 MHz per [ $^1\text{H}$ ] e 125.6 MHz per [ $^{13}\text{C}$ ]. Gli esperimenti DEPT,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC e HMBC sono stati eseguiti con programmi di sequenze pulsate e utilizzando, in base al composto in analisi, il solvente deuterato adatto.

**Spettroscopia UV-Vis:** Gli spettri UV/Vis sono stati registrati su uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 7.

**Spettroscopia IR:** Gli spettri IR sono stati registrati su uno strumento Jasco FT/IR-430, usando la cella ZnSe, per composti polari solubili in  $\text{CH}_3\text{OH}$  o  $\text{H}_2\text{O}$ , e la cella NaCl per composti solubili in  $\text{CHCl}_3$ .

**Cromatografia:** Le analisi cromatografiche HPLC sono state eseguite con uno strumento Agilent 1100 dotato di rivelatore ad assorbanza UV e uno strumento Waters 1525 con rivelatore a serie di fotodiodi Waters 2996, selezionando i sistemi cromatografici adatti a ogni singola analisi.

A scopi preparativi è stato utilizzato uno strumento Shimadzu LC- 8A con rivelatore UV SPD-10A VP.

Le analisi TLC sono state eseguite in scala analitica su fogli di alluminio Kiesselgel 60 F<sub>254</sub>, o RP-18 F<sub>254</sub>), con spessore dello strato di 0.2 mm. Per le analisi TLC in scala semi-preparativa e preparativa sono state usate lastre Kiesselgel 60 F<sub>254</sub> di spessore 0,5 e 1,0 mm. Le macchie su lastra sono state rilevate grazie a lampade UV o per carbonizzazione utilizzando una miscela H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (1:20:4).

### **Composti chimici**

La soluzione di NaOCl (10% di cloro disponibile) è stata acquistata dalla Fluka. L'acqua, utilizzata in tutti gli esperimenti e nella preparazione delle soluzioni acquose, è stata purificata in un sistema di filtrazione MilliQ (Millipore). La soluzione di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a titolo noto (0.1024 N), è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich. I solventi usati sono tutti di grado HPLC.

### **Procedura generale di clorazione**

Le soluzioni di NaOCl, utilizzate per gli esperimenti, sono state ottenute per diluizione della soluzione commerciale e il cloro attivo disponibile è stato valutato attraverso titolazione iodometrica.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente e i pH delle soluzioni sono stati monitorati durante il tempo di reazione. La

soluzione di  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  è stata utilizzata in alcuni esperimenti per disattivare l'eccesso di  $\text{NaOCl}$ .

## 5.1 Atenololo

### Composti chimici

L'atenololo e la 2-(4-idrossifenil)acetammide sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Tempo	[Atenololo]/[NaOCl]	Prodotti
30'	1:1.5	<b>1; 4</b>
1h	1:1.5	<b>1; 2; 3</b>
1h	1:8	<b>1; 2; 3</b>
1h "quenched"	1:8	<b>2; 3; 4; atenololo</b>

Le soluzioni con  $[\text{atenololo}]/[\text{NaOCl}] = 1:1.5$  sono preparate sciogliendo 90 mg di farmaco in 1 L di soluzione 452  $\mu\text{M}$  di  $\text{NaOCl}$ .

Le soluzioni con  $[\text{atenololo}]/[\text{NaOCl}] = 1:8$  sono ottenute sciogliendo 90 mg di atenololo in 1L di soluzione 2.75 mM di  $\text{NaOCl}$ .

Trascorso il tempo di reazione, durante il quale il pH rimane pressochè costante (10.2→9.9 nell'esperimento con  $[\text{atenololo}]/[\text{NaOCl}] = 1:1.5$  e 10.9→10.6 nell'esperimento con

[atenololo]/[NaOCl] = 1:8) le soluzioni acquose sono evaporate al Rotavapor e il residuo è ripreso con CH<sub>3</sub>OH.

Mediante cromatografia su TLC preparativa [*eluente*: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO = 8/2] si ottiene l'isolamento dei composti **1**, **2** e di una miscela che per successiva purificazione all'HPLC porta all'isolamento del composto **3**.

Per tale purificazione cromatografica è impiegato lo strumento preparativo della Shimadzu utilizzando il seguente sistema cromatografico: *colonna*: Phenomenex Luna, C18, 10 µm, 250 x 10.0 mm; *eluenti*: A) H<sub>2</sub>O Milli-Q e B) miscela CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>CN=1/1 (v/v); *flow*: 1.4 ml/min; *UV@240nm*; *eluizione in gradiente*: t=0, A=90%, t=15, A=90%, t=16, A=80%, t=26, A=80%, t=30, A=50%, t=43, A=0%.

Nell'esperimento a tempi ridotti (30') attraverso cromatografia su TLC [*eluente*: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH = 9.5/0.5] si ottiene l'isolamento dei composti **1** e **4**.

Per gli esperimenti LC/MS e per l'analisi della miscela derivante dall'esperimento quenched con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2ml) è utilizzato lo strumento HPLC Agilent con il seguente sistema cromatografico: *colonna*: Phenomenex Sinergy Hydro RP-80A, C18, 4 µ, 250 x 4.6 mm; *eluenti*: miscela CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>CN=1/1 (v/v) e H<sub>2</sub>O Milli-Q; *flow*: 0.5 ml/min; *UV@240nm*; *eluizione in gradiente*: t=0, A=90%, t=15, A=90%, t=16, A=80%, t=26, A=80%, t=30, A=50%, t=43, A=0%.

## Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 1:**  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.21 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2' e H-6'), 6.90 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3' e H-5'), 4.58 (1H, m, H-2''), 4.09 (2H, d,  $J = 4.9$  Hz, H-1''), 3.76 (1H, dd,  $J = 12.7, 6.8$  Hz,  $H_a$ -3''), 3.64 (1H, dd,  $J = 12.7, 7.8$  Hz,  $H_b$ -3''), 3.44 (2H, s, H-2), 1.48 (6H, s, H-6'' e H-7'');  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 177.9 (C-1), 159.7 (C-4'), 131.8 (C-2' e C-6'), 129.9 (C-1'), 116.2 (C-3' e C-5'), 104.0 (C-5''), 76.0 (C-2''), 71.1 (C-1''), 63.2 (C-3''), 43.0 (C-2), 27.4 e 25.8 (C-6'' e C-7''); ESI-MS:  $m/z$  299.0  $[\text{M}-\text{HCl}+\text{H}]^+$ , 321.0  $[\text{M}-\text{HCl}+\text{Na}]^+$ ; IR ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  (ZnSe): 3339, 3166, 2915, 1632, 1404, 1244, 1032, 828; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm ( $\log \epsilon$ ): 222 (3.23), 276 (2.63), 283 (2.57).

**Composto 3:**  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 8.10 (1H, s, H-5''), 7.21 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2' e H-6'), 6.91 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3' e H-5'), 4.02 (1H, m, H-2''), 3.94 (2H, m, H-1''), 3.53 (1H, dd,  $J = 13.7, 4.9$  Hz,  $H_a$ -3''), 3.44 (2H, s, H-2), 3.35 (1H, dd,  $J = 13.7, 6.8$  Hz,  $H_b$ -3'');  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 177.8 (C-1), 164.7 (C-5''), 159.8 (C-4'), 131.7 (C-2' e C-6'), 129.7 (C-1'), 116.2 (C-3' e C-5'), 71.6 (C-2''), 70.2 (C-1''), 43.0 (C-2), 42.5 (C-3''); ESI-MS:  $m/z$  253.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 275.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 291.0  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  (NaCl) 3002.4, 2941.6, 2827.1, 1737.0, 1607.3, 1503.5, 1342.6, 1095.1, 1021.8; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm ( $\log \epsilon$ ): 218 (3.17), 230 (3.12), 276 (2.57), 283 (2.51).

**Composto 4:**  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.22 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2' e H-6'), 6.90 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3' e H-5'), 3.95 (2H, m, H-1'' e H-2''), 3.44 (2H, s, H-2), 2.89 (1H, dd,  $J = 13.0, 2.9$  Hz,  $\text{H}_a\text{-3''}$ ), 2.76 (1H, dd,  $J = 13.0, 6.8$  Hz,  $\text{H}_b\text{-3''}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 177.9 (C-1), 159.7 (C-4'), 131.8 (C-2' e C-6'), 129.9 (C-1'), 116.2 (C-3' e C-5'), 71.6 (C-2''), 71.1 (C-1''), 46.3 (C-3''), 43.0 (C-2); ESI-MS:  $m/z$  225.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 247.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 263.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ; IR( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  (ZnSe) 3490, 1635, 1242, 964; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm ( $\log \epsilon$ ): 269 (4.74).

## 5.2 Ranitidina

### Composti chimici

La ranitidina, come sale di HCl, e la soluzione di  $\text{CH}_2\text{O}$  (37%) sono state acquistate dalla Sigma. La 5-(idrossimetil)-2-furaldeide e l'alcool furfurilico sono stati acquistati presso la Aldrich. La  $\text{NH}(\text{CH}_3)_2^* \text{HCl}$  è stata ottenuta dalla Carlo Erba.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Tempo	[Ranitidina]/[NaOCl]	Prodotti
2'	1:2	<b>11; 12; 13; ranitidina</b>
10'	1:2	<b>11; 12; 13; ranitidina</b>
1h	1:2	<b>11; 12; 13; ranitidina</b>
1h	1:10	<b>11; 12; 13; 14</b>

Le soluzioni con  $[\text{ranitidina}]/[\text{NaOCl}] = 1:2$  sono preparate sciogliendo 105 mg di farmaco in 1L di soluzione 563  $\mu\text{M}$  di NaOCl. Le soluzioni con  $[\text{ranitidina}]/[\text{NaOCl}] = 1:10$  sono ottenute sciogliendo 97 mg in 1L di soluzione 2.75 mM di NaOCl.

Durante il tempo di reazione, il pH resta pressoché costante per l'esperimento con rapporto molare 1:2 (da 9.08 a 9.06) mentre nel caso dell'esperimento con rapporto molare 1:10 il pH varia da 10.2 a 8.04. Dopo il tempo di reazione, le soluzioni acquose sono seccate sotto vuoto e il residuo è ripreso con  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

La miscela derivante dall'esperimento  $[\text{ranitidina}]/[\text{NaOCl}] = 1:2$  (1h) è stata cromatografata su TLC preparativa [eluyente:  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3/(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}/\text{NH}_3 = 7/4/1$ ], portando all'isolamento dei composti **11**, **12** e **13** e parte di farmaco non reagito.

Negli esperimenti a tempi ridotti il profilo cromatografico della miscela è identico ad eccezione delle rese molari dei prodotti.

Mediante cromatografica su TLC [eluyente:  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3/(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}/\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3 = 6/3/1$ ] della miscela derivante dall'esperimento  $[\text{ranitidina}]/[\text{NaOCl}] = 1:10$  si ottiene l'isolamento dei composti **11**, **12**, **13**, e **14**.

### **Sintesi del 5-N,N-dimetilaminometil-2-furilmetanolo (16)**

A 2 ml di alcool furfurilico si aggiungono 1.90 g di  $\text{NH}(\text{CH}_3)_2^* \text{HCl}$  alla temperatura di  $37^\circ\text{C}$ , sotto agitazione magnetica. Si aggiungono

poi 2 ml di una soluzione acquosa di CH<sub>2</sub>O (37%), goccia a goccia in un tempo totale di 2h. La reazione procede per altre 20h in continua agitazione alla stessa temperatura. La miscela di reazione è poi basificata fino a pH 12 per aggiunta di una soluzione di NaOH. Infine si estrae con toluene (3 volte) e le fasi organiche si riuniscono e anidrificano con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La miscela, filtrata e seccata, è poi purificata su colonna di silice [*eluenti*: A) (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O/etere di petrolio = 1/1; B) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] recuperando 148 mg del prodotto desiderato (dati spettroscopici in accordo con Haywood et al., 1987).

#### **Clorazione del 5-N,N-dimetilaminometil-2-furilmetanolo (16)**

17 mg del composto **16** sono sciolti in 2ml di H<sub>2</sub>O. Si aggiungono 200 µl della soluzione al 10% di NaOCl in modo da avere un [composto **16**]/[NaOCl]=1:2. Dopo circa 20 minuti si estrae con CHCl<sub>3</sub> (3 volte) e le fasi organiche riunite sono purificate su TLC [*eluente*: CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH/N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> = 6/3/1] il composto **14** e **16**.

#### **Dati fisici dei prodotti isolati**

**Composto 11:** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 6.45 (1H, d, *J*= 3.1 Hz, H-6), 6.35 (1H, d, *J*= 3.1 Hz, H-5), 4.34 (1H, d, *J*= 14.0 Hz, H<sub>a</sub>-9), 4.22 (1H, d, *J*= 14.0 Hz, H<sub>b</sub>-9), 3.72 (2H, s, H-3), 3.70 (2H, m, H-12), 3.20 (1H, m, H<sub>a</sub>-11), 3.00 (1H, m, H<sub>b</sub>-11), 2.90 (3H, s, H-18), 2.40 (6H, s, H-2 e

H-2');  $C^{13}$  NMR ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  158.7 (C-14), 153.0 (C-4), 145.2 (C-7), 114.4 (C-6), 113.6 (C-5), 56.1 (C-3), 51.6 (C-11), 51.5 (C-9), 45.0 (C-2, C-2'), 37.0 (C-12) 31.2 (C-18); ESI-MS:  $m/z$  331.1  $[M+H]^+$ .

**Composto 12:**  $^1H$  NMR ( $CD_3$ ) $_2$ SO:  $\delta$  9.00 (1H, s, H-17),  $\delta$  6.69 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-6), 6.51 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-5), 4.35 (1H, d,  $J= 14.0$  Hz,  $H_a$ -9), 4.20 (1H, d,  $J= 14.0$  Hz,  $H_b$ -9), 4.26 (2H, s, H-3), 3.68 (2H, m H-12), 3.21 (1H, m,  $H_a$ -11), 3.00 (1H, m,  $H_b$ -11), 2.93 (3H, s, H-18), 2.63 (6H, s, H-2 e H-2');  $^{13}C$  NMR ( $CD_3$ ) $_2$ SO:  $\delta$  158.0 (C-14), 146.9 (C-7), 115.6 (C-6), 112.5 (C-5), 51.5 (C-3), 49.9 (C-11), 49.3 (C-9), 41.6 (C-2 e C-2'), 38.5 (C-12), 31.0 (C-18); ESI-MS:  $m/z$  365.0  $[M+H]^+$ , 367.0  $[M+2+H]^+$  (33%).

**Composto 13:**  $H^1$  NMR ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  6.43 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-6), 6.34 (1H, d,  $J= 3.0$  Hz, H-5), 4.29 (1H, d,  $J= 14.5$  Hz,  $H_a$ -9), 4.11 (1H, d,  $J= 14.5$  Hz,  $H_b$ -9), 3.55 (2H, s, H-3), 3.65 (2H, m, H-12), 3.10 (3H, s, H-18), 3.10 (1H, m,  $H_a$ -11), 2.90 (1H, m,  $H_b$ -11), 2.40 (6H, s, H-2 e H-2');  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  154.0 (C-4), 152.4 (C-14), 146.4 (C-7), 112.6 (C-5), 113.9 (C-6), 56.4 (C-3), 54.2 (C-11), 51.6 (C-9), 45.3 (C-2 e C-2'), 42.6 (C-12) 32.3 (C-18); ESI-MS:  $m/z$  399.8  $[M+H]^+$ , 401.8  $[M+2+H]^+$  (65%), 403.8  $[M+4+H]^+$  (10%), 421.9  $[M+Na]^+$ , 423.9  $[M+2+Na]^+$  (65%).

## 5.3 Naprossene

### Composto chimico

Il naprossene è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich come sale sodico.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Le soluzioni con  $[\text{naprossene}]/[\text{NaOCl}] = 1:2$  sono preparate sciogliendo 100 mg di farmaco in 1 L di soluzione 870  $\mu\text{M}$  di NaOCl. La reazione procede per 1 h a temperatura ambiente; il pH della soluzione passa da 6.2 a 5.0. Dopo 1h la soluzione acquosa è portata a secco al Rotavapor e il residuo è ripreso con  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

Il campione secco è cromatografato su colonna di silice flash dando le frazioni A ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3 = 9/1$ ), B ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3 = 1/1$ ) e C ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ).

La frazione A è stata ulteriormente purificata su TLC [*eluente*: n-esano/ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3 = 9/1$ ], recuperando il prodotto **17** (21%).

La frazione B ha restituito dalla purificazione su TLC [*eluente*: n-esano/ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3 = 8/2$ ] i prodotti **18** (2%) e **19**. Infine dalla TLC [*eluente*: n-esano/ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3 = 1/1$ ] della frazione C è stato recuperato il prodotto **19** (8%).

## Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 17:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.40 (1H, d,  $J= 1.5$  Hz, H-1), 8.01 (1H, dd,  $J= 1.5, 8.5$  Hz, H-3), 7.86 (1H, d,  $J= 9.0$  Hz, H-8), 7.77 (1H, d,  $J= 8.5$  Hz, H-4), 7.21 (1H, dd,  $J= 2.5$  e  $9.0$  Hz, H-7), 7.16 (1H, d,  $J= 2.5$  Hz, H-5), 3.96 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.70 (3H, s, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  197.8 (CO), 159.7 (C-6), 137.2 (C-2), 132.5 (C-10), 131.1 (C-1), 131.1 (C-8), 130.0 (C-9), 127.0 (C-4), 124.6 (C-3), 119.6 (C-7), 105.7 (C-5), 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 26.5 (C-13).

**Composto 18:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.75 (3H, m, H-1, H-4 e H-8), 7.47 (1H, dd,  $J= 1.8$  e  $8.7$  Hz, H-3), 7.16 (1H, dd,  $J= 2.5$  e  $9.0$  Hz, H-7), 7.14 (1H, d,  $J= 2.5$  Hz, H-5), 5.12 (1H, q,  $J= 7.0$  Hz, H-11), 3.93 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 1.55 (3H, d,  $J= 7.0$  Hz, H-13).

**Composto 19:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.77 (3H, m, H-1, H-4 e H-8), 7.52 (1H, dd,  $J= 1.8$  e  $8.7$  Hz, H-3), 7.20 (1H, dd,  $J= 2.0$  e  $9.0$  Hz, H-7), 7.18 (1H, s, H-5), 5.04 (1H, q,  $J= 7.0$  Hz, H-11), 3.97 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 1.62 (3H, d,  $J= 7.0$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157.6 (C-6), 140.9 (C-2), 134.0 (C-10), 129.4 (C-1), 128.7 (C-9), 127.1 (C-8), 124.4 (C-3), 123.7 (C-4), 118.9 (C-7), 105.7 (C-5), 70.5 (C-11), 55.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 25.0 (C-13).

## 5.4 Gemfibrozil

### Composti chimici

I tre fibrati, gemfibrozil, bezafibrato e fenofibrato sono stati acquistati presso la Aldrich.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

La soluzione con  $[\text{gemfibrozil}]/[\text{NaOCl}] = 1:1.9$  è preparata sospendendo 104 mg di farmaco in 1 L di soluzione 804  $\mu\text{M}$  di NaOCl.

La soluzione con  $[\text{gemfibrozil}]/[\text{NaOCl}] = 1:9.5$  è preparata sospendendo 13 mg di farmaco in 150 mL di soluzione 492  $\mu\text{M}$  di NaOCl.

Le reazioni procedono per 1 h sotto agitazione magnetica a pH costante pari a 7.6. Le sospensioni acquose sono concentrate al Rotavapor ed estratte con  $\text{CHCl}_3$  (3 volte). La fase organica derivante dall'esperimento con  $[\text{gemfibrozil}]/[\text{NaOCl}] = 1:1.9$  è separata mediante HPLC, restituendo il farmaco (2.7%) e il prodotto **20** (4.1%). Per la separazione è impiegato lo strumento preparativo della Shimadzu utilizzando il seguente sistema cromatografico: *colonna*: Lichrosorb C18, 7  $\mu\text{m}$ , Hibar, 250 x 25.0 mm; *eluenti*: A)  $\text{CH}_3\text{CN}$  e B)  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q; *flow*: 1.2 ml/min; *UV@254 e 280nm*; *eluizione isocratica*: A:B=3:7.

## Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 20:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.03 (1 H, s, H-3'), 6.76 (1H, s, H-6'), 3.92 (2H, t,  $J= 6.5$  Hz, , H-6), 2.28 (3H,s, H-8'), 2.12 (3H, s, H-7'); 1.78 (2H, m, H-5), 1.64 (2H, m, H-4), 1.15 (6H, s, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  186.1 (C-1), 157.7 (C-1'), 135.3 (C-5'), 131.7 (C-3'), 127.8 (C-4'), 126.0 (C-2'), 115.2 (C-6'), 70.5 (C-6), 44.5 (C-2), 39.4 (C-5), 27.2 (C-4), 27.1 (C-3), 20.5 (C-8'), 16.2 (C-7'); ESI-MS:  $m/z$  285.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 287.8  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  (33%), 307.8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 309.8  $[\text{M}+2+\text{Na}]^+$ (33%), 267.7  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O} +\text{H}^+]$ , 239.7  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}+\text{H}^+]$ ; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  (NaCl) 3300-2500, 1712, 1670, 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

## 5.5 Lincomicina

### Composti chimici

La lincomicina è stata ottenuta dalla Sigma come sale di HCl.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Le soluzioni con  $[\text{lincomicina}]/[\text{NaOCl}] = 1:2$  sono preparate sciogliendo 140 mg di farmaco in 1 L di soluzione 690  $\mu\text{M}$  di NaOCl. Durante il tempo di reazione (1 h), il pH resta costante a 6.0. La

soluzione acquosa è poi seccata sotto vuoto e il residuo, ripreso con  $\text{CH}_3\text{OH}$ , è filtrato su millex 0.45  $\mu\text{m}$ .

Dalla cromatografia su TLC [*eluente*:  $\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NH}_3$  =3/6/1], s'isolano il composto **21** (15.7%) e la miscela di prodotti **22** (1.9%).

### **Saggio di Nelson-Somogyi per gli zuccheri riducenti**

A 300  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  contenenti 100  $\mu\text{g}$  di campione sono aggiunti 300  $\mu\text{l}$  di reattivo del rame, si mescola e si tiene a 100° C per 15 minuti.

100  $\mu\text{l}$  del reattivo di arsenio molibdato sono diluiti con 200  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.5 N e aggiunti al campione. Si agita e poi si aggiunge 1 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ . Si esegue infine la lettura dell'assorbanza a 520 nm. Si misura un valore di  $A_{520} = 0.254$

- Il reattivo del rame è preparato sciogliendo in 70 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  2.8 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e 4.0 g di tartrato di sodio. Si aggiungono 10 ml di  $\text{NaOH}$  1N, 8 ml di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (soluzione al 10%) e 18 g di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Si porta a volume (100 ml) con  $\text{H}_2\text{O}$ . Dopo due giorni e infine si filtra il reattivo per eliminare la presenza di un deposito solido.

- Il reattivo di arsenio molibdato è preparato sciogliendo in 90 ml di H<sub>2</sub>O 5.0 g di ammonio molibdato (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, si aggiungono 4.2 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5N e 5 ml di H<sub>2</sub>O contenenti 0.6 g di Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O. Il reattivo è incubato a 37° C per 48 h e posto in bottiglia di vetro scura.

### Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 21:** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 4.60 (1H, d, *J*= 6.0 Hz, H-1), 4.41 (1H, d, *J*= 8.0 Hz, H-5), 4.34 (1H, dd, *J*= 10.0, 6.0 Hz, H-2), 4.19 (1H, dd, *J*= 8.0, 5.5 Hz, H-6), 4.05 (1H, m, H-4), 4.04 (1H, m, H-7), 4.00 (1H, m, H-3), 3.28 (1H, m, H<sub>a</sub>-5'), 3.12 (1H, dd, *J*= 11.0, 8.2 Hz, H-2'), 2.77 (3H, s, SO-CH<sub>3</sub>), 2.45 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2.20 (2H, m, H-4' e H<sub>b</sub>-5'), 2.02 (1H, m, H<sub>a</sub>-3'), 1.78 (1H, m, H<sub>b</sub>-3') 1.35 (2H, m, H-1''), 1.31 (2H, m, H-2''), 1.25 (3H, s, H-8), 0.93 (3H, t, *J*= 6.6 Hz, H-3''); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 176.9 (CO), 95.0 (C-1), 76.6 (C-5), 72.0 (C-4), 70.4 (C-3), 69.9 (C-2'), 69.0 (C-2), 68.6 (C-7), 63.6 (C-5'), 56.0 (C-6), 41.7 (N-CH<sub>3</sub>), 38.8 (C-4'), 38.4 (C-3'), 36.8 (C-1''), 36.5 (SO-CH<sub>3</sub>), 22.6 (C-2''), 19.7 (C-8), 14.6 (C-3''); MALDI-MS: *m/z* 423.1 [M+H]<sup>+</sup>, 445.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Composto 22:** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 5.12 (1H, d, *J*= 3.2 Hz, H-1<sub>α</sub>), 4.43 (1H, d, *J*= 7.6 Hz, H-1<sub>β</sub>); MALDI-MS: *m/z* 377.2 [M+H]<sup>+</sup>.

## 5.6 Tamoxifen

### Composti chimici

Il tamoxifen, la soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) e MnO<sub>2</sub> sono stati acquistati presso la Sigma.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Le soluzioni con [tamoxifen]/[NaOCl] = 1:2 sono preparate sospendendo 125 mg di farmaco in 1 L di soluzione 672 μM di NaOCl.

La soluzione con [tamoxifen]/[NaOCl] = 1:10 è stata preparata sospendendo 25 mg del farmaco in 200 ml di soluzione 672 μM di NaOCl.

Trascorso il tempo di reazione (1h), le sospensioni acquose sono seccate al Rotavapor e i residui solidi sono ripresi con (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

Il campione derivante dall'esperimento con [tamoxifen]/[NaOCl] = 1:2 è caricato su colonna di silice flash e cromatografato dando le frazioni A (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH= 9.5/0.5), contenente il farmaco non reagito e B(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH= 8/2), dalla cui purificazione su TLC [*eluente*: CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH = 9/1] si recupera il composto **23** (6.9%).

Il campione derivante dall'esperimento con [tamoxifen]/[NaOCl] = 1:10 è purificato su TLC [*eluente*: CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH = 9/1] dando il prodotto **23** e il tamoxifen non reagito.

### Sintesi dell'N-ossido del tamoxifen (**23**)

9.3 mg di tamoxifen sono sciolti in 1 ml di CH<sub>3</sub>OH e posti in un bagno ad acqua e ghiaccio. Sono aggiunti 4.82 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (soluzione al 35%) in modo da avere un rapporto molare tamoxifen/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 1:2. La reazione procede over-night sotto agitazione magnetica, alla temperatura di 30° C. Dopo aver raffreddato la miscela di reazione in bagno ad acqua e ghiaccio, si spegne l'eccesso di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aggiungendo MnO<sub>2</sub> finchè non termina lo sviluppo di ossigeno. La soluzione è purificata su SEP-PAK [*eluente*: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH = 9/1] recuperando 6.8 mg del prodotto **23**.

### Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 23:** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.20–6.80 (14 H, Ar–H), 4.21 (2H, t, *J*= 3.8 Hz, CH<sub>2</sub>O), 3.64 (2H, t, *J*= 3.8 Hz, CH<sub>2</sub>N) 3.26 (6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N), 2.45 (2H, q, *J*= 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H,t, *J*= 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR δ (CDCl<sub>3</sub>) 155.5, 143.6, 142.2, 136.5, 132.0, 129.6, 129.4, 128.1, 127.9, 126.6, 126.1, 113.4 (14 C, Ar–C), 70.1 (CH<sub>2</sub>N), 61.8 (CH<sub>2</sub>O), 59.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N), 29.0 e 13.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). ESI-MS: *m/z* 388.2 [M+H]<sup>+</sup>.

## 5.7 Sildenafil

### Composti chimici

Il sildenafil è stato acquistato come citrato, alla KEMPROTEC Limited.

### Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Tempo	[Sildenafil]/[NaOCl]	Prodotti
20'	1:6	<b>24; 25; 26</b>
5'	1:11	<b>24; 25; 26</b>
20'	1:11	<b>24; 25; 26</b>
1h	1:11	<b>24; 25; 26</b>
20'	1:18	<b>24; 25; 26</b>

La soluzione con  $[\text{sildenafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:6$  è preparata sciogliendo 12 mg di sildenafil in 50 mL di soluzione 152  $\mu\text{M}$  di NaOCl. Le soluzioni con  $[\text{sildenafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:11$  sono preparate sciogliendo 45 mg di sildenafil in 500 mL di soluzione 1.04 mM di NaOCl. La soluzione con  $[\text{sildenafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:18$  è ottenuta sciogliendo 44 mg di sildenafil in 500 mL di soluzione 1.67 mM di NaOCl.

Dopo il tempo di reazione, le soluzioni acquose sono concentrate al Rotavapor ed estratte con  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  (3 volte). Dalla purificazione delle fasi organiche su TLC [*eluente*:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{COCH}_3 = 9/1$ ], sono stati isolati i prodotti **24**, **25** e di una miscela che per successiva purificazione TLC [*eluente*:

CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> = 9/1] porta all'isolamento del composto **26**.

### Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 24:** H<sup>1</sup> NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 8.19 (1H, s, H-15), 7.90 (1H, dd, *J*= 9.0, 2.0 Hz, H-17), 7.40 (1H, d, *J*= 9.0 Hz, H-18), 4.31 (2H, q, *J*= 7.0 Hz, H-20), 4.24 (3H, s, H-10), 3.31 (4H, bs, H-23 e H-27), 3.22 (4H, bs, H-24 e H-26), 2.89 (2H, t, *J*= 7.5 Hz, H-11), 1.82 (2H, sest, *J*= 7.5 Hz, H-12), 1.47 (3H, t, *J*= 7.0 Hz, H-21), 1.00 (3H, t, *J*= 7.5 Hz, H-13); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 161.7 (C-19), 157.1 (C-7), 150.0 (C-5), 147.5 (C-3), 140.0 (C-9), 133.2 (C-17), 131.7 (C-15), 129.1 (C-16), 124.4 (C-8), 114.3 (C-18), 66.7 (C-20), 61.6 (C-24 e C-26), 47.1 (C-23 e C-27), 38.4 (C-10), 28.4 (C-11), 23.4 (C-12), 14.7 (C-21), 14.2 (C-13); ESI-MS: *m/z* 495.0 [M+H]<sup>+</sup>, 497.0 [M+2+H]<sup>+</sup> (33%), 517.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 533.1 [M+K]<sup>+</sup>.

**Composto 25:** H<sup>1</sup> NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 10.8 (1H, bs, H-6), 8.84 (1H, d, *J*= 2.0 Hz, H-15), 7.88 (1H, dd, *J*= 9.0, 2.0 Hz, H-17), 7.16 (1H, d, *J*= 9.0 Hz, H-18), 4.39 (2H, q, *J*= 6.5 Hz, H-20), 4.28 (3H, s, H-10), 3.72 (2H, s, H-23), 3.45 (2H, d, *J*= 5.5 Hz, H-26), 3.42 (2H, d, *J*= 5.5 Hz, H-27), 2.94 (2H, t, *J*= 7.5 Hz, H-11), 2.94 (3H, s, H-28), 1.87 (2H, m, H-12), 1.65 (3H, t, *J*= 6.5 Hz, H-21), 1.04 (3H, t, *J*= 7.5 Hz, H-13); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 163.7 (C-24), 159.8 (C-19), 153.5 (C-7), 147.7 (C-3), 146.0 (C-5), 139.0 (C-9), 131.8 (C-17), 131.1 (C-15), 129.0 (C-16), 124.5

(C-8), 121.4 (C-14), 113.3 (C-18), 66.2 (C-20), 48.8 (C-23), 48.2(C-26), 43.0 (C-27), 38.2 (C-10), 34.1 (C-28), 27.7 (C-11), 22.2 (C-12), 14.4 (C-21), 14.0 (C-13); ESI-MS:  $m/z$  489.1 [M+H]<sup>+</sup>, 511.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Composto 26:** H<sup>1</sup> NMR (CD<sub>3</sub>OD): 8.27 (1H, s, H-15), 8.00 (1H, dd,  $J= 9.0, 2.0$  Hz, H-17), 7.33 (1H, d,  $J= 9.0$  Hz, H-18), 4.30 (2H, q,  $J= 7.0$  Hz, H-20), 4.24 (3H, s, H-10), 3.18 (2H, bt, H-23), 3.10 (2H, bt, H-24), 2.98 (2H, t,  $J= 7.5$  Hz, H-11), 2.70 (3H, s, H-28), 1.80 (2H, sest,  $J= 7.5$  Hz, H-12), 1.47 (3H, t,  $J= 7.0$  Hz, H-21), 1.00 (3H, t,  $J= 7.5$  Hz, H-13); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  160.0 (C-19), 156.1 (C-7), 150.6 (C-5), 147.8 (C-3), 139.0 (C-9), 133.0 (C-17), 132.1 (C-16), 131.5 (C-15), 124.8 (C-8 e C-14), 114.8 (C-18), 67.1 (C-20), 50.1 (C-24), 41.1 (C-23), 38.9 (C-10), 34.0 (C-28), 28.8 (C-11), 24.0 (C-12), 15.2 (C-21), 14.7 (C-13); ESI-MS:  $m/z$  449.1 [M+H]<sup>+</sup>; IR (CH<sub>3</sub>OH):  $\nu_{\max}$  (ZnSe): 2918, 2846, 2338, 1685, 1532, 1459, 1158, 1013.

## 5.8 Tadalafil

### Composti chimici

Il tadalafil è stato acquistato alla KEMPROTEC Limited.

## Clorazione del farmaco e isolamento dei prodotti

Tempo	[Tadalafil]/[NaOCl]	Prodotti
30'	1:7	<b>Tadalafil; 27</b>
1h	1:7	<b>Tadalafil; 27</b>
1h	1:18	<b>27; 28; 29</b>
1h	1:22	<b>27; 28; 29</b>

Le soluzioni con  $[\text{tadalafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:7$  sono preparate sospendendo 61 mg di tadalafil in 1L di soluzione 1.10 mM di NaOCl.

La soluzione con  $[\text{tadalafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:18$  è ottenuta sospendendo 36 mg di tadalafil in 500 mL di soluzione 1.67 mM di NaOCl.

La soluzione con  $[\text{tadalafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:22$  è preparata sospendendo 29.5 mg di tadalafil in 500 mL di soluzione 1.67 mM di NaOCl.

Dopo il tempo di reazione, durante il quale il pH resta costante al valore di 10, soluzioni acquose sono concentrate al Rotavapor ed estratte con  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  (3 volte) . Dalla purificazione di tutte le fasi acquose mediante SEP-PAK in fase diretta ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), si ottiene l'isolamento del prodotto **27**. Le fasi organiche, seccate, sono purificate su TLC [*eluente*:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{COCH}_3 = 9/1$ ], portando all'isolamento dei prodotti **27**, **28**, negli esperimenti con  $[\text{tadalafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:18$  e  $[\text{tadalafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:22$  e al tadalafil di partenza negli esperimenti con  $[\text{tadalafil}]/[\text{NaOCl}] = 1:7$ .

## Dati fisici dei prodotti isolati

**Composto 28:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.90 (1H, s, H-5), 7.60 (1H, dd,  $J=8.5, 1.0$  Hz, H-6'), 7.42 (1H, d,  $J=1.0$  Hz, H-2'), 7.31 (1H, s, H-8), 7.29 (1H, s, H-11), 6.80 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 6.04 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 4.83 (1H, t,  $J=7.3$  Hz, H-12a), 4.21 (1H, d,  $J=17.6$  Hz,  $\text{H}_a$ -3), 3.88 (1H, d,  $J=17.6$  Hz,  $\text{H}_b$ -3), 3.21 (2H, d,  $J=7.3$  Hz, H-12), 2.96 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  191.4 (C-6), 165.4 (C-2), 164.5 (C-4), 152.0 (C-5'), 148.1 (C-3'), 142.0 (C-7a), 131.1 (C-11a), 130.8 (C-11), 129.7 (C-1' e C-6a), 127.0 (C-6'), 126.0 (C-9), 123.4 (C-8), 116.2 (C-10), 110.0 (C-2'), 107.7 (C-5'), 101.9 (C-11b e  $\text{CH}_2$ ), 58.3 (C-12a), 53.2 (C-3), 44.9 (C-12), 33.7 (Me); ESI-MS:  $m/z$  508.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 509.9  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  (96%), 511.9  $[\text{M}+4+\text{H}]^+$  (31%), 529.9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 531.9  $[\text{M}+2+\text{Na}]^+$  (96%), 533.8  $[\text{M}+4+\text{Na}]^+$  (31%), 545.9  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 547.9  $[\text{M}+2+\text{K}]^+$  (96%), 549.9  $[\text{M}+4+\text{K}]^+$  (31%).

**Composto 29:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 10.08 (1H, s, H-7), 7.90 (1H, s, H-5), 7.60 (1H, dd,  $J=8.5, 1.0$  Hz, H-6'), 7.42 (1H, d,  $J=1.0$  Hz, H-2'), 7.31 (1H, s, H-8), 7.29 (1H, s, H-11), 6.80 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 6.04 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 4.83 (1H, t,  $J=7.3$  Hz, H-12a), 4.21 (1H, d,  $J=17.6$  Hz,  $\text{H}_a$ -3), 3.88 (1H, d,  $J=17.6$  Hz,  $\text{H}_b$ -3), 3.21 (2H, d,  $J=7.3$  Hz, H-12), 2.96 (3H, s,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  191.4 (C-6), 165.4 (C-2), 164.5 (C-4), 152.0 (C-5'), 148.1 (C-3'), 142.0 (C-7a), 131.1 (C-11a), 130.8 (C-11), 129.7 (C-1' e C-6a), 127.0 (C-6'), 126.0 (C-9), 123.4 (C-8), 116.2 (C-10), 110.0 (C-2'), 107.7 (C-5'), 101.9 (C-11b e  $\text{CH}_2$ ), 58.3 (C-12a), 53.2 (C-3), 44.9 (C-12), 33.7 (Me); ESI-MS:  $m/z$  474.0

[M+H]<sup>+</sup>, 476.0 [M+2+H]<sup>+</sup> (65%), 478.0 [M+4+H]<sup>+</sup> (10%), 496.0  
[M+Na]<sup>+</sup>, 498.0 [M+2+Na]<sup>+</sup> (65%), 500.0 [M+4+Na]<sup>+</sup> (10%), 511.9  
[M+K]<sup>+</sup>, 513.8 [M+2+K]<sup>+</sup> (65%), 515.9 [M+4+K]<sup>+</sup> (10%).

## 6. Procedure test di tossicità

### 6.1 Test di fitotossicità

Il Pendimetalin, erbicida utilizzato come controllo nei test, è stato acquistato come miscela commerciale (Pendulum<sup>®</sup>) presso l'Ingegoli S.p.a (Milano, Italia). I semi di *Lactuca sativa* L. (cv Cavolo di Napoli) utilizzati, sono stati acquistati dall'Ingegoli S.p.a. e selezionati per uniformità, scartando tutte le sementi danneggiate e sotto taglia. Nel test sono state utilizzate capsule di Petri (50 mm di diametro) con l'aggiunta di un foglio di carta da filtro Whatman N. 1, come supporto. Gli esperimenti di germinazione e crescita sono stati condotti in soluzioni acquose a pH controllato con tampone MES (acido 2-[N-morfolin]-etansolfonico, 10 mM, pH 6.0). Gli esperimenti sono stati eseguiti in 4 differenti capsule alle stesse concentrazioni e ripetuti tre volte in tempi differenti al fine di verificarne l'attendibilità.

Sono state preparate per ciascun composto in esame soluzioni 10<sup>-4</sup> M, sciogliendo il composto puro nel tampone MES. Le soluzioni test a concentrazioni inferiori (10<sup>-5</sup>÷10<sup>-7</sup> M) sono state ottenute per diluizione da quest'ultime. In parallelo sono stati eseguiti i controlli. Alle

capsule, ciascuna contenente 25 semi, sono aggiunti 2.5 ml della soluzione contenente il composto da saggiare; le capsule sono state sigillate con parafilm<sup>®</sup> al fine di evitare interferenze da parte di agenti esterni, e incubate in una camera di crescita (KBW Binder 240) a 25°C al buio. Dopo 5 giorni, le capsule sono state poste in freezer a -10°C per 24 ore per bloccare l'eventuale crescita, durante il completamento del processo di misura. Ciò consente di ottenere una maggiore accuratezza soprattutto nelle misure dell'allungamento della radice e dell'ipocotile.

I dati sono riportati in grafico come differenze percentuali rispetto al controllo. Lo zero è determinato dal controllo e tutti i valori positivi sono un indice di stimolazione del parametro studiato mentre i valori negativi ne rappresentano un'inibizione.

## **6.2 Test di tossicità acuta e cronica**

I test di tossicità, acuta e cronica, sono stati condotti utilizzando differenti organismi della catena trofica acquatica: il rotifero *Brachionus calyciflorus* e i crostacei, appartenenti a due ordini differenti, *Thamnocephalus platyurus* e *Ceriodaphnia dubia*.

Gli organismi si trovano in stadi criptobiotici, cioè stadi di sospensione delle loro attività vitali, tra cui la quasi completa cessazione del loro metabolismo, ma con la capacità di ridiventare attivi quando ritornano le condizioni favorevoli (temperatura, disponibilità di nutrienti). Tutti gli organismi sono stati forniti in questo stadio da MicroBioTests Inc.,

Nazareth, Belgio. Il test su *B. calyciflorus* è stato condotto in accordo alle procedure standard riportate dalla guida ASTM E 1440-91 per la tossicità acuta (American Society for Testing and Materials, 1991), e ISO/CD 20666 (International Organization for Standardization, 2001a) per la tossicità cronica. I test di tossicità acuta sugli altri due organismi sono stati eseguiti secondo il protocollo U.S.EPA, 1993 (U.S. Environmental Protection Agency).

Il test di tossicità cronica su *C. dubia* è stato condotto secondo le procedure ISO/CD 20665 (International Organization for Standardization, 2001b).

Al fine di ottenere le soluzioni da saggiare a diverse concentrazioni, tutti i composti sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO), e poi diluiti in acqua deionizzata in modo da mantenere la concentrazione di DMSO <0,01% v/v. Tale concentrazione, come provato nei test preliminari, è una dose di non effetto e quindi non invalida i risultati dei test. Prima dell'allestimento di ciascun test è stato effettuato uno screening preliminare per stabilire l'intervallo di concentrazione entro il quale deve essere eseguita la prova finale in modo da trovare le concentrazioni di massimo (100%) e minimo (0%) effetto. I parametri considerati per la valutazione sono stati: per la tossicità acuta, la mortalità o la mobilità, mentre per la tossicità cronica, l'inibizione della riproduzione ( $EC_{50}$ , *half maximal effective concentration*, concentrazione in grado di indurre il 50% dell'effetto massimo possibile sugli organismi testati). Al fine di verificare l'accuratezza e la precisione del test, in modo tale che  $EC_{50}$  cadesse

nelle gamme di tossicità note per ciascun organismo, sono state valutate le risposte di ciascun organismo agli effetti di una sostanza tossica selezionata:  $K_2Cr_2O_7$  (Sigma-Aldrich Chemicals) per *B. calyciflorus* e  $C_6Cl_5ONa$  per *C. dubia* e *T. platyurus*.

In parallelo a ciascun test sono stati condotti i controlli negativi, in cui gli organismi si trovano a contatto con il solo mezzo di mantenimento.

Ogni composto è stato testato a cinque differenti concentrazioni per ciascun test e ogni diluizione è stata esaminata in diverse repliche, in base all'organismo, al fine di comprovarne il dato.

***B. calyciflorus***: le cisti del rotifero sono state preparate alla schiusa il giorno prima del test. In ogni capsula di Petri sono state adagiate cinque cisti, poste in acqua sintetica standard ed incubate per 16-18 h a 25°C, costantemente illuminate a 3.000-4.000 lux . Poi gli organismi sono stati sottoposti alle soluzioni in esame. Il test è stato eseguito in 36 piastre, cinque animali per piastra, a ciascuna delle quali sono aggiunti 0,3 ml della diluizione di prova. In questo test ogni concentrazione è stata riprodotta in sette repliche.

Le piastre sono state poi incubate al buio per circa 24 ore alla temperatura di 25°C, trascorse le quali si annota il numero di rotiferi morti ed i valori percentuali di mortalità per ogni concentrazione in ciascuna delle sette repliche. La concentrazione trovata per uccidere il 50% dei rotiferi in 24 ore è stata indicata come  $LC_{50}$  (*half maximal lethal concentration*).

L'inibizione della crescita della popolazione (tossicità cronica) di *B. calyciflorus* è stata misurata in 48 ore di esposizione. La schiusa delle cisti è stata innescata un giorno prima, come per il test di tossicità acuta. Per il test è stato posto un organismo per piastra e a esso aggiunti 0,9 ml del campione da saggiare e, come l'alimentazione, 100 µl di una sospensione fresca di alga verde *P. subcapitata* (107 cellule / ml).

Il test è stato eseguito in quattro repliche per ciascuna concentrazione. Le piastre sono state poste in incubatore a 25°C, al buio, per 48 ore, trascorse le quali sono stati contati i neonati e, dal confronto con il controllo, è stato possibile determinare la concentrazione che ha dato luogo al 50% dell'inibizione sulla crescita della popolazione.

***T. platyurus***: il crostaceo è stato utilizzato nei test nella II fase larvale. È stata innescata la schiusa delle cisti ponendole in una capsula di Petri, cui è stata aggiunta un'acqua sintetica diluita per diminuirne la pressione osmotica e incubando le capsule per 20-22 h a 25°C, sotto continua illuminazione a 3.000-4.000 lux. Le larve appena schiuse sono state poi poste in acqua non diluita per passare così alla II fase larvale. Il test è stato eseguito in 24 piastre, ciascuna contenente dieci animali. A ogni piastra sono stati aggiunti 1,0 ml della soluzione da testare. In questo test ogni concentrazione è stata riprodotta in tre repliche. Dopo 24 ore in incubatore a 25 ° C al buio, è stato registrato il numero di crostacei morti e quindi trovata la LC<sub>50</sub>.

***C. dubia***: per i test sono stati usati neonati di *C. dubia* (meno di 24 ore di vita), nati da efippi 4 giorni prima del test, per incubazione in

vaschette di vetro contenenti un'acqua sintetica standard a 25 °C sotto illuminazione continua (fonte luminosa a 6000 lux).

Per il test di tossicità acuta sono state preparate 24 piastre, ognuna con dieci organismi e 1,0 ml di soluzione del campione da saggiare. In questo test ogni concentrazione è stata riprodotta in tre repliche. Dopo 48 h al buio a 25°C è stato contato nelle piastre incubate il numero di organismi immobilizzati, considerando come immobili quelli non in grado di nuotare dopo lieve agitazione del liquido in 15 s di osservazione, anche se ancora capaci di spostare le antenne. La concentrazione alla quale si raggiunge il 50% d'immobilizzazione in 48 ore, è stata indicata come EC<sub>50</sub>.

Per il test di tossicità cronica gli organismi usati devono essere neonati da madri di terza generazione.

Gli organismi sono stati esposti singolarmente a sette concentrazioni differenti. In un beacker è stato posto un solo organismo con 20 ml della soluzione da saggiare. Nel corso del test, che ha una durata di sette giorni, gli organismi sono stati alimentati quotidianamente con 100 µl di una sospensione costituita da concentrato dell'alga *P. subcapitata*, cibo per pesci ed estratto di lievito granulare. Ogni concentrazione è stata saggiata in dieci repliche. Ogni beacker è posto in incubazione a 25°C con cicli di luce (500 lux) di 16 ore alternati a cicli di buio di 8 ore.

È stata monitorata la sopravvivenza degli organismi e dal terzo giorno in poi, al momento del rinnovo del mezzo, sono stati contati i nuovi

individui nati. Alla fine dei sette giorni dal confronto tra il numero di neonati nei campioni in esame e il controllo, è stata determinata la concentrazione che ha causato 50% d'inibizione della crescita della popolazione,  $EC_{50}$ .

### **6.3 Test di mutagenicità e genotossicità**

Sono stati condotti inoltre il test di Ames su *Salmonella typhimurium*, test di mutagenesi genica, e il SOS chromotest su *Escherichia coli*, per la valutazione dell'attività genotossica.

- **Test di Ames**

Il test, definito anche test di reversione batterica per incorporazione su piastra, è in genere applicabile a campioni solubili in acqua o in solventi organici compatibili con la crescita batterica. Il principio del test di Ames si basa sulla retromutazione poiché utilizza ceppi di *Salmonella typhimurium* recanti ognuno un diverso tipo di mutazione nell'operone *his* che codifica per la biosintesi dell'istidina. In tal modo questi ceppi sperimentali sono divenuti auxotrofi per questo amminoacido e quindi incapaci di crescere in terreni privi di esso. La positività al test è quindi valutata dal numero dei revertenti, cioè il numero di colonie batteriche cresciute in assenza dell'istidina. Infatti, a seguito di una retromutazione, i batteri riacquistano il fenotipo del

ceppo originale, cioè revertertono alla condizione di produttori d'istidina, per riattivazione dei geni dell'operone *his* alterati.

L'utilizzo di due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare diversi tipi di danni genici; in particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di una o più basi (mutazioni frameshift) mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di una singola base (mutazioni puntiformi). Questi ceppi sono stati selezionati e proposti dal protocollo APHA, 1998 (American Public Health Association), poiché riconosciuti a livello internazionale per essere i più sensibili all'evidenziazione delle sostanze mutagene in matrici ambientali.

Prima di eseguire il test, i ceppi sono stati sottoposti a prove preliminari per verificarne l'idoneità genetica.

I batteri congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  sono stati riattivati e con essi sono state preparate delle colture liquide utilizzate dopo 12 ore in modo che le cellule fossero in fase di crescita esponenziale. Ciò garantisce che un elevato numero di batteri ( $1-2 \times 10^9$  batteri/ml).

Ciascun composto è stato saggiato in cinque differenti concentrazioni, preparate in acqua sterile e come previsto dal protocollo standard, ogni concentrazione è stata replicata tre volte. Parallelamente sono stati allestiti un controllo negativo e uno positivo. Il controllo negativo è stato preparato con acqua sterile, i controlli positivi sono stati allestiti usando mutageni standard, specifici per ogni ceppo (sodio azide per TA100 e 2-nitrofluorene per TA98).

Le piastre, contenenti il terreno di coltura, 100  $\mu$ l della coltura batterica e 100  $\mu$ l del campione da saggiare, sono state incubate a 37°C al buio per 72 ore. Terminato il periodo d'incubazione, è stato contato il numero di batteri revertenti su ogni piastra, e in questo modo è stato espresso il risultato finale.

È stato calcolato infine il rapporto di mutagenicità (R.M.), che è il rapporto tra il numero di revertenti rilevato per il campione e il numero di colonie mutate spontaneamente che è stato rilevato nelle piastre contenenti il controllo negativo.

- **SOS Chromotest**

È un saggio batterico spettrofotometrico e quantitativo, comunemente associato al test di Ames nell'ambito dei test a breve termine, usati per la ricerca di sostanze capaci di modificare il genoma.

Esso è in grado di fornire un'indicazione su un danno al DNA attraverso la misura dell'attivazione del sistema di riparo SOS di *Escherichia coli*.

Si utilizza un ceppo del batterio PQ37, geneticamente modificato, privo di attività  $\beta$ -galattosidica costitutiva e in cui la produzione dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi è proporzionale all'attivazione del meccanismo di riparazione, provocato dal potere genotossico della sostanza saggiata.

L'attività enzimatica, direttamente proporzionale all'attività genotossica del prodotto, è stata dosata spettrofotometricamente a 406 nm grazie all'uso di un substrato cromogeno, *o*-nitrofenil- $\beta$ -galattopiranoside. Esso in seguito all'azione idrolitica dell'enzima dà origine all'*o*-nitrofenolo, di colore giallo.

In parallelo è stata monitorata l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina, che a differenza della  $\beta$ -galattosidasi che è inducibile, è un enzima costitutivo, per cui una sua riduzione è indice di sofferenza cellulare. Monitorando in parallelo la sua attività, in maniera del tutto analoga, con l'utilizzo di *p*-nitrofenilfosfato che è trasformato dall'enzima in *p*-nitrofenolo di cui è dosata l'assorbanza, è possibile fornire indicazioni attendibili sulla tossicità del campione eliminando la possibilità di falsi negativi.

I batteri congelati sono stati riattivati in terreno nutritivo per un giorno, poi sono stati messi a contatto col campione e dopo 2 ore d'incubazione a 37°C sotto agitazione, sono effettuate le misure di  $A_{406}$ . Le soluzioni da saggiare sono state preparate usando una soluzione allo 0,9% di NaCl (soluzione fisiologica).

Con lo stesso solvente è stato preparato il controllo negativo, che permette di stimare l'attività enzimatica in condizioni ottimali di crescita. Inoltre è stato preparato un controllo positivo in due concentrazioni (1  $\mu$ g/ml e 5  $\mu$ g/ml) usando un mutageno standard, la 4-nitrochinolina, per valutare la capacità di risposta del ceppo. Dopo l'incubazione è stata indotta, attraverso l'uso di specifici buffer, la lisi delle cellule batteriche con rilascio degli enzimi prodotti nel mezzo. A

questo punto sono state realizzate le misure spettrofotometriche a 406 nm, la prima al tempo zero e una successiva dopo 20 minuti. Sono state calcolate le attività enzimatiche (espresse in unità U.E.) come rapporto tra la differenza dei valori di  $A_{406}$  e il tempo (20 minuti) per 1000. Infine dal rapporto delle due differenti attività enzimatiche

$$R = U.E._{\beta\text{-gal}} / U.E._{\text{P-alk}}$$

è stata valutata l'attività genotossica del campione. Al fine di confrontare i risultati ottenuti in differenti esperimenti, è stato determinato il fattore d'induzione  $I.F. = R_c / R_0$  dove  $R_0$  è il rapporto R misurato a concentrazione zero, cioè nel controllo negativo, e  $R_c$  rappresenta il rapporto R per il campione alla concentrazione C testata.

## 7. Bibliografia

- Andreozzi, R.; Marotta, R.; Paxeus, N.; “Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment” *Chemosphere* **2003**, *50*, 1319-1330.
- Andrisano, V.; Gotti, R.; Leoni, A.; Cavrini, V.; “Photodegradation studies on Atenolol by liquid chromatography” *J. Pharmaceut. Biomed.* **1999**, *21*, 851-857.
- APHA Standard methods for the examination of water and wastewater 20<sup>th</sup> ed., 8030 B Salmonella Microsomal Mutagenity Test, Washington DC: American Public Health Association, 1998.
- Armesto, X. L.; Canle, M.; Carretero, P.; García, M. V.; Santaballa, J. A.; “Evidence for an intramolecular elimination mechanism in aqueous decomposition of (N-Cl)-alcoholamines” *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2565-2572.
- Armesto, X. L.; Canle, M.; García, M. V.; Santaballa, J. A.; “Aqueous chemistry of N-halo-compounds” *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 453-460.
- Ashon, D.; Hilton, M.; Thomas, K. V.; “Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom” *Sci. Total Environ.* **2004**, *333*, 167-184.
- ASTM. Standard guide for acute toxicity with the rotifer *Brachionus*. E 1440-91, Philadelphia PA USA, American Society for Testing and Materials 1991.

- Audeh, C. A.; Lindsay Smith, J. R.; “Amine oxidation. Part II. The oxidation of some trialkylamine with alkaline potassium hexacyanoferrate (III)” *J. Chem. Soc. (B)* **1970**, 1280-1285.
- Baker, R.; Chanu, B.; Goy-Loeper, J.; “Evaluation a long terme de l'activite hypolipidemiante et de la tolerance du fenofibrate” *Prog. Med.* **1982**, *110*, 18-24.
- Bedner, M.; Maccrehan, W. A.; “Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and *N*-Acetyl-*p*-benzoquinone Imine” *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 516-522.
- Böhme, H.; Sadanandam, Y. S.; “Über aminale und halbaminale von- $\alpha$ -ketoaldehyden. *Arch. Pharmaz.* **1973**, *306*, 227-236.
- Bosca, F.; Martinez-Mañes, R.; Miranda, M. A.; Primo, J.; Soto, J.; Vaño, L.; “Oxidative decarboxylation of naproxen” *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 479-482.
- Bottoni, P.; Fidente, R.; “Un primo contributo alla problematica dei farmaci come contaminanti delle acque” *Ann. Ist. Super. Sanità* **2005**, *41*, 333-342.
- Boyd, G. R.; Zhang, S.; Grimm, D. A.; “Naproxen removal from water by chlorination and biofilm processes” *Water Res.* **2005**, *39*, 668-676.
- Buth, J. M., Arnold, W. A., Mc Neill, K.; “Unexpected products and reaction mechanisms of the aqueous chlorination of cimetidine” *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 6228-6233.

- Calamari, D.; Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; “Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy” *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 1241-1248.
- Caraballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Llombart, M.; García-Jares, C.; Rodríguez, I.; Gómez, M.; Ternes, T.; “Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant” *Water Res.* **2004**, *38*, 2918-2926.
- Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; Pomati, F.; Calamari, D.; Zuccato, E.; “Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy” *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 357-363.
- Cermola, F.; Della Greca, M.; Iesce, M. R.; Previtiera, L.; Rubino, M.; Temussi, F.; Brigante, M.; “Phototransformation of fibrate drugs in aqueous media” *Environ. Chem. Lett.* **2005**, *3*, 43-47.
- Chen, C-Y; Lin, J-H; “Toxicity of chlorophenols to *Pseudokirchneriella subcapitata* under air-tight test environment” *Chemosphere* **2006**, *62*, 503-509.
- Cinquini, M.; Colonna, S.; Landini, D.; “Kinetics of  $\alpha$ -chlorination of sulphoxides by iodobenzene dichloride” *J. Chem. Soc. Perk. T. 2* **1972**, 296-300.
- Cleuvers, M.; “Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects” *Toxicol. Lett.* **2003**, *142*, 185-194.
- Coogan, M. A.; Edziyie, R. E.; La Point, T. W.; Venables, B. J.; “Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a

North Texas wastewater treatment plant receiving stream”  
*Chemosphere* **2006**, *67*, 1911-1918.

- Daughton, C. G.; Ternes, T. A.; “Special report: pharmaceuticals and personal care products in the environment: agent of subtle change?”  
*Environ. Health Perspect* **1999**, *107*, 907-938.
- Della Greca, M.; Brigante, M.; Isidori, M.; Nardelli, A.; Previtera, L.; Rubino, M.; Temussi, F.; “Phototransformation and ecotoxicity of the drug Naproxen-Na” *Environ. Chem. Lett.* **2004a**, *1*, 237-241.
- Della Greca, M.; Fiorentino, A.; Isidori, M.; Lavorgna, A.; Previtera, L.; Rubino, M.; Temussi, F.; “Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organism” *Chemosphere* **2004b**, *54*, 629-637.
- Della Greca, M.; Iesce, M. R.; Isidori, M.; Nardelli, A.; Previtera, L.; Rubino, M.; “Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms”  
*Chemosphere* **2007**, *67*, 1933-1939.
- Della Greca, M.; Iesce, M. R.; Pistillo, P.; Previtera, L.; Temussi, F.; “Unusual products of the aqueous chlorination of atenolol”  
*Chemosphere* **2009**, *74*, 730-734.
- De Rosa, M.; Triana Alonso, J. L.; “Studies of the mechanism of chlorination of indoles. Detection of N-chloroindole and 3-chloro-3H-indole as intermediates” *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2639-2343.

- Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D.; “Ecotoxicology of human pharmaceuticals” *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 122-159.
- Glassmeyer, S. T.; Shoemaker, J. A.; “Effects of Chlorination on the Persistence of Pharmaceuticals in the Environment” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *74*, 24-31.
- Gray, J. S.; “Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist” *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *45*, 46-52.
- Halling-Sørensen, B.; Nielsen, N.; Lansky, P. F.; Ingerslev, F.; Hansen Lützhøft, H. C.; Jørgensen, S. E.; “Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review” *Chemosphere* **1998**, *36*, 357-394.
- Harvengt, C.; Heller, F.; Desagfer, J. P.; “Hypolipidemic and hypouricemic action of fenofibrate in various types of hyperlipoproteinemias” *Artery* **1982**, *7*, 73-82.
- Haywood, P. A.; Martin-Smith, M.; Cholerton, T. J.; Evans, B. M.; “Isolation and identification of the hydrolytic degradation products of ranitidine hydrochloride” *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1987**, 951-954.
- Heberer, T.; “Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data” *Toxicol. Lett.* **2002a**, *131*, 5-17.
- Heberer, T.; “Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water” *J. Hydrol.* **2002b**, *266*, 175-189.

- Heberer, T.; Reddersen, K.; Mechlinski, A.; “From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas” *Water Sci. Technol.* **2002**, *46*, 81-88.
- Hilton, M. J.; Thomas, K. V.; “Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry” *J. Chromatogr. A* **2003**, *1015*, 129-141.
- Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K. L.; “Occurrence of antibiotics in the aquatic environment” *Sci. Total Environ.* **1999**, *225*, 109-118.
- Isidori, M.; Lavorgna, M.; Nardelli, A.; Parrella, A.; Previtiera, L.; Rubino, M.; “Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products” *Sci. Total Environ.* **2005**, *348*, 93-101.
- Isidori, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L.; Rubino, M Parrella, A.; “Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms” *Environ. Int.* **2007**, *3*, 635-641.
- Isidori, M.; Parrella, A.; Pistillo, P.; Temussi, F.; “ Effects of ranitidine and its photoderivates in the aquatic environment” *Environ. Int.* **2009**, *35*, 821-825.
- ISO. Water quality - Algal growth inhibition test. ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 1989.

- ISO. Water quality - Determination of chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48h - Population growth inhibition test. ISO/CD 20666. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 2001.
- ISO. Water quality - Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days - Population growth inhibition test. ISO/CD 20665. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 2001.
- Jjemba, P. K.; “Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment” *Ecotox. Environ. Safe.* **2006**, *63*, 113-130.
- Jobling, S.; Casey, D.; Rodgers-Gray, T.; Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Pawlowski, S.; Baunbeck, T.; Turner, A.P.; Tyler, C. R.; “Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent” *Aquat. Toxicol.* **2004**, *66*, 207-222.
- Joo, S. H.; Mitch, W. A.; “Nitrile, aldehyde, and halonitroalkane formation during chlorination/chloramination of primary amines” *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1288-1296.
- Kitis, M.; “Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review” *Environ. Int.* **2004**, *30*, 47-55.
- Klein, J.; Stollar, H.; “The stereochemistry of chlorination of thiane 1-oxides” *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7437-7444.

- Kowalski, P.; Mitka, K.; Ossowska, K.; Kolarska, Z.; “Oxidation of sulfides to sulfoxides. Part 1: Oxidation using halogen derivatives” *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1933-1953.
- Kümmerer, K. “Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review” *Chemosphere*, **2001**, *45*, 957-969.
- Kümmerer, K., (Ed), *Pharmaceuticals in the Environment*. **2004** Springer-Verlag: Heidelberg.
- Larsson, D. G .J.; Adolfsson-Erici, M.; Parkkonen,J.; Pettersson, M.; Berg, A. H.; Olsson, P.-E.; Förlin, L.; “Ethinylestradiol — an undesired fish contraceptive?” *Aquat. Toxicol.* **1999**, *45*, 91-97.
- Leather, G. R.; “Weed control using allelopathic crop plants” *J. Chem. Ecol.* **1983**, *9*, 983-989.
- Lewis, S. N 1971. In: Augustine, R. L. (Ed), *Oxidation Volume I* **1971** Marcel Dekker, Inc., New York, pp 248-249.
- Li, J.; Blatchley III, E. R.; “Volatile Disinfection Byproduct Formation Resulting from Chlorination of Organic-Nitrogen Precursors in Swimming Pools” *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 6732-6739.
- Liberti, L.; Notarnicola, M.; “Advanced treatment and disinfection for municipal wastewater reuse in agriculture” *Wat. Sci. Tech.* **1999**, *40*, 235-245.

- Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L.; “Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters” *Water Res.* **2005**, *39*, 2219-2228.
- Loos, R.; Wollgast, J.; Huber T.; Hanke, G.; “Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy” *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*,1469-1478.
- Macias, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M. G.; “Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species” *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2512-2521.
- Masui, M.; Sayo, H.; Tsuda, Y.; “Anodic oxidation of amines. Part I. Cyclic voltammetry of aliphatic amines at a stationary Glassy-carbon electrode” *J. Chem. Soc. (B)* **1968**, 973-976.
- Mimeault, C.; Woodhouse, A.; Miao, X. S.; Metcalfe, C. D.; Moon, T. W.; Trudeau, V. L.; “The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*” *Aquat. Toxicol.* **2005**, *73*, 44-54.
- Nanni, E. J.; Sawyer, D. T.; “Free radical and electron transfer mechanisms for tertiary amine oxidation” *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7593-7595.
- Öllers, S.; Singer, H. P.; Fässler, P.; Müller, S. R.; “Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at

the low-ng/ l level in surface and waste water” *J. Chromatogr. A* **2001**, *911*, 225-234.

- Pinkston, K. E.; Sedlak, D. L.; “Transformation of aromatic ether- and amine-containing pharmaceuticals during chlorine disinfection” *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 4019-4025.
- Pomati, F.; Castiglioni, S.; Zuccato, E.; Fanelli, R.; Vigetti, D.; Rossetti, C.; Calamari, D.; “Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells” *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2442-2447.
- Reddersen, K.; Heberer, T.; Dünbier, U.; “Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water” *Chemosphere* **2002**, *49*, 539-544.
- Richardson, M. L.; Bowron, J. M.; “The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment” *J. Pharm. Pharmacol.* **1985**, *37*, 1-12.
- Richardson, M. L.; Thruston Jr., A. D.; Caughran, T. V.; Chen, P. H.; Collette, T. W.; Schenck, K. M.; Lykins, Jr., B. W.; Rav-acha, C.; Glezer, V.; “Identification of new drinking water disinfection byproducts from ozone, chlorine dioxide, chloramine, and chlorine” *Water Air Soil Poll.* **2000**, *123*, 95-102.
- Rosal, R.; Rodea-Palomares, I.; Boltes, K.; Fernández-Piñas, F.; Leganés, F.; Gonzalo, S.; Petre, A.; “Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three

aquatic organisms” *Environ. Sci. Pollut. R.* **2009**, DOI 10.1007/s11356-009-0137-1.

- Rosenblatt, D. H.; Hull, L. A.; De Luca, D. C.; Davis, G. T.; Weglein, R. C.; Williams, H. K. R.; “Oxidations of Amines. II. Substituent effects in chlorine dioxide oxidations” *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1158-1163.
- Rothenberg, G.; Sasson, Y.; Extending the haloform reaction to non-methyl ketones: oxidative cleavage of cycloalkanones to dicarboxylic acids using sodium hypochlorite under phase transfer catalysis conditions” *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13641-13648.
- Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E.; “Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain)” *Environ. Int.* **2007**, *33*, 596-601.
- Schiliró, T.; Pignata, C.; Fea, E.; Gilli, G.; “Toxicity and Estrogenic Activity of a Wastewater Treatment Plant in Northern Italy” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 456-462.
- Schwan, A. L.; Strickler, R. R.; Dunn-Dufault, R.; Brillon, D.; “Oxidative fragmentations of 2-(trimethylsilyl)ethyl sulfoxides routes to alkane-, arene-, and highly substituted 1-alkenesulfinyl chlorides” *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1643-1654.
- Shi, X.-X.; Liu, S.-L.; Xu, W.; Xu, Y.-L.; “Highly stereoselective Pictet-Spengler reaction of D-tryptophan methyl ester with piperonal:

convenient syntheses of Cialis (Tadalafil), 12a-*epi*-Cialis, and their deuterated analogues” *Tetrahedron-Asymmetr.* **2008**, *19*, 435-442.

- Sinha, R. P.; Häder, D.-P.; “UV-induced DNA damage and repair: a review” *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225-236.
- Stumpf, M.; Ternes, T. A.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W.; “Polar drug residues in sewage and natural waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil” *Sci. Total Environ.* **1999**, *225*, 135-141.
- Sugise, T.; Hayashida, Y.; Hanafusa, T.; Nanjo, E.; Yamashita, I.; “Monitoring of Vasculogenesis-Inhibiting Activities in Sewage Effluents by Using Medaka Embryos” *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2051-2055.
- Ternes, T. A.; “Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers” *Water Res.* **1998**, *32*, 3245-3260.
- Thomas, K. V.; Hilton, M. J.; “The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries” *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, *49*, 436-444.
- Tixier, C.; Singer, H. P.; Oellers, S.; Müller, S.R.; “Occurrence and fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in surface waters” *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 1061-1068.
- U.S. EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 4<sup>th</sup> ed. EPA-600-

4-90-027F. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency 1993.

- Yamamoto, T.; Yasuhara, A.; “Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds” *Chemosphere* **2002**, *46*, 1215-1223.
- Yu, J. Q.; Matsui, Y.; “Phytotoxicity substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.)” *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 21-31.
- Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M.; Fanelli, R.; “Presence of therapeutic drugs in the environment” *Lancet* **2000**, *355*, 1789-1790.
- Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Fanelli, R.; “Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment” *J. Hazard. Mater.* **2005**, *122*, 205-209.
- Zurita, J. L.; Repetto, G.; Jos, Á.; Salguero, M.; López-Artíguez, M.; Cameán, A. M.; “Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems” *Aquat. Toxicol.* **2007**, *81*, 106-115.

## ***8. Abstract***

### ***Xenobiotics in Sewage Treatment Wastewaters (STWs). Studies on the chemical transformations in STWs - like conditions.***

Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) include cosmetics, pharmacological products, products employed in food farming to improve livestock growth and/or health. PPCPs continuous and massive use justifies their finding in different aquatic ecosystems and due to the improvement of sensitivity and accuracy of the analytic techniques, the scientific community has been able to identify the contribution to pollution of this common usage substances.

PPCPs compose a variegated collection of chemical substances among which drugs are of particular interest for the purposes of this study. They have been designed to be active at very low concentration, to pass through biological membranes and to persist in the organism sufficiently to carry out their therapeutic effect before being secreted through urines or faeces. Thus they can have a substantial impact on the environment and to serious consequences on human health.

Drugs are released into the environment through several ways, from landfill disposal of drugs (unused or out of date), to sewage disposal of households, hospitals, factories and intensive cattle farming. A big amount of drugs and of their metabolic products reaches the STPs

(Sewage Treatment Plants) where treatment processes are often not capable of inducing mineralization of xenobiotics, thus allowing their inlet into surface waters. It is therefore extremely important to evaluate to what extent a drug is removed during wastewater disposal. The percentage of removal of a certain drug from wastewater not only depends on its mineralization, but also on its capacity to be transformed into a different chemical substance during treatments, in particular during disinfection step. The most used disinfection processes are: UV irradiation, chlorination, ozone or peroxyacetic acid oxidation.

Chlorination is the most used sterilization process in the world. Chlorine is normally added to wastewater as gas or as a sodium hypochlorite solution (NaOCl). Hypochlorite disinfection is the most commonly used disinfection treatment in Italy. The mixture HOCl/OCl<sup>-</sup>, known as free available chlorine (FAC), is a powerful non-specific oxidant, capable of inducing degradation of different micro-pollutants to products which are chlorinated, oxidized and to fragmentation by-products that are potentially more toxic than the parental compound.

Many data on the possibility that chlorination could induce drug transformation are available in recent literature but data on the identification of eventual transformation product are limited to few cases.

This thesis work has been focused on studying transformations induced by hypochlorite treatment on drugs belonging to different pharmaceutical classes, in STPs like-conditions.

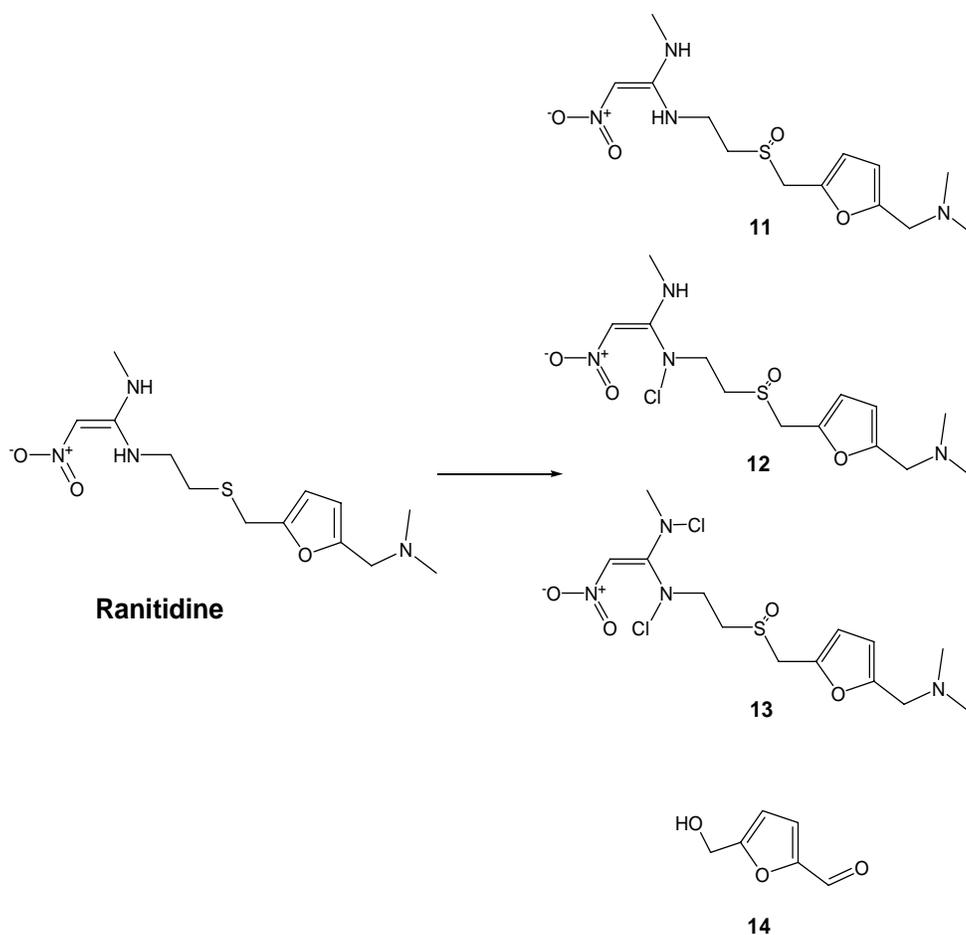
Selection has been based on the following parameters:

- Presence in the molecular structure of potentially reactive groups;
- High use and sale of drugs containing the selected active ingredient;
- Literature data on the detection of drugs in STP effluents;
- Environmental load.

The drugs examined in this study are: atenolol, ranitidine, naproxen, gemfibrozil, benzaifibrate and fenofibrate, tamoxifen, lincomycin, sildenafil and tadalafil. The main degradation products were isolated and fully characterized employing NMR techniques (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) and mass spectrometry experiments (ESI-MS, MALDI-MS, EI-MS). The formation pathways were also elucidated.

Atenolol, a  $\beta$ -blocker drug used for cardiovascular dysfunction therapy, is considered one of the main emerging pollutants of Italian aquatic environments because of its high concentration in the effluents of Italian STPs and, as a consequence, in the receiving surface waters. We have found that atenolol is highly reactive following hypochlorite

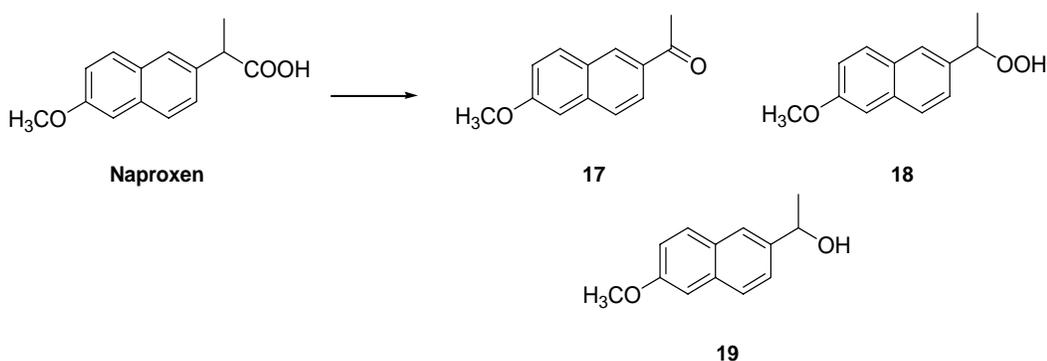




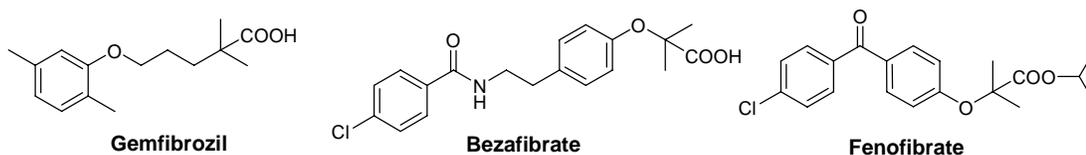
This drug is transformed into compounds **11**, **12**, **13** and **14** upon hypochlorite treatment. Total degradation of the original compound and formation of product **14** is obtained only in hypochlorite excess conditions. Products **11**, **12**, **13** are obtained also at low hypochlorite doses already after two minutes of contact. Products **11**, **12** and **13** formation occurs by oxidation of the sulfide groups to sulfoxide and N-chlorination reaction of secondary amino groups. We hypothesize that product **14** formation relies on a S-chlorination reaction to form the chlorosulfoxonium intermediate. This intermediate undergoes

nucleophilic attack of water, with cleavage of the C-S bond. At the same time, oxidation of the furanic ring-bound tertiary amino function occurs under hypochlorite excess conditions leading to formation of an aldehydic function.

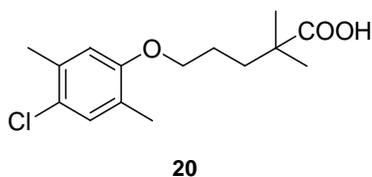
Naproxen, a non steroidal anti-inflammatory drug, gives rise to oxidative decarboxylation product formation upon hypochlorite treatment.



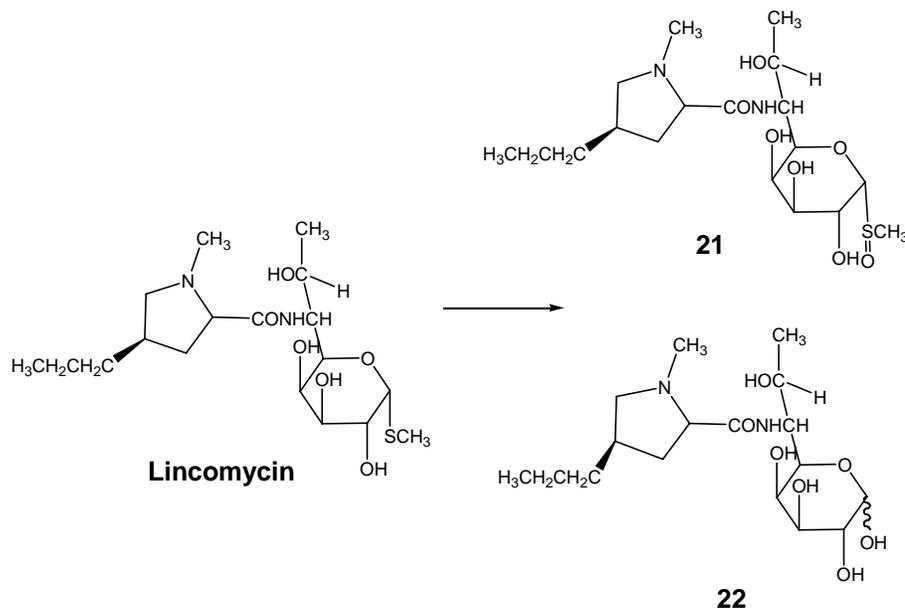
Other drugs analyzed are fibrate gemfibrozil, bezafibrate and fenofibrate, drugs employed for treatment of hyperlipidemia, an elevation of cholesterol or triglycerides in the bloodstream.



Gemfibrozil only resulted reactive toward chlorination, leading to formation of a unique product **20**, which is obtained by chlorination of the aromatic ring and to almost complete degradation of the drug with all the different hypochlorite concentration tested in the experiments.

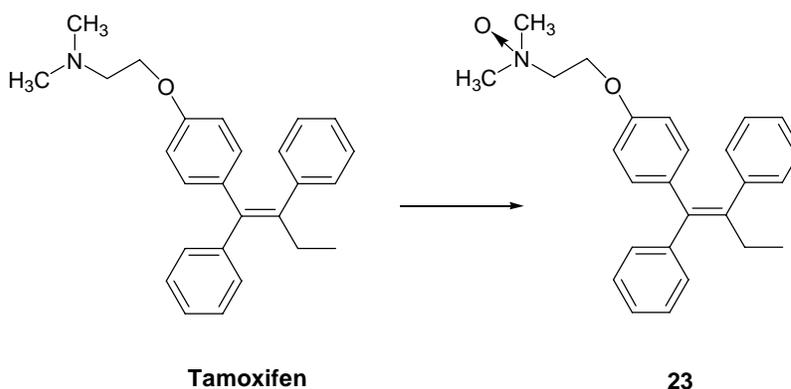


Lincomycin, a lincosamide antibiotic, showed a high reactivity toward the treatment. The drug undergoes a complete degradation with formation of a sulfoxide product **21** and a hemiacetal mixture **22**.



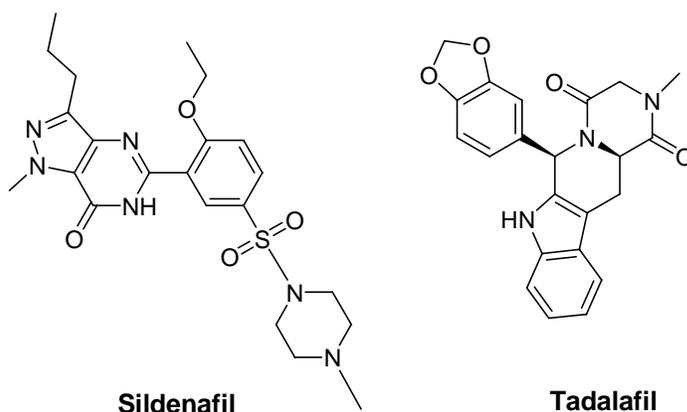
Tamoxifen is currently considered the most used chemotherapeutic employed in breast cancer care. Although not many data are available on its environmental finding, its genotoxic activity and capability to increase endometrial tumor risk is well documented.

Upon hypochlorite treatment, this drug is not completely degraded but it is mostly transformed into the oxidized product **23**. N-oxides are very often more biologically active than the corresponding tertiary amines: in fact they are known not only as important pharmacological, but also toxicological agents. Moreover, some of them are considered capable of inducing spontaneous tumours.

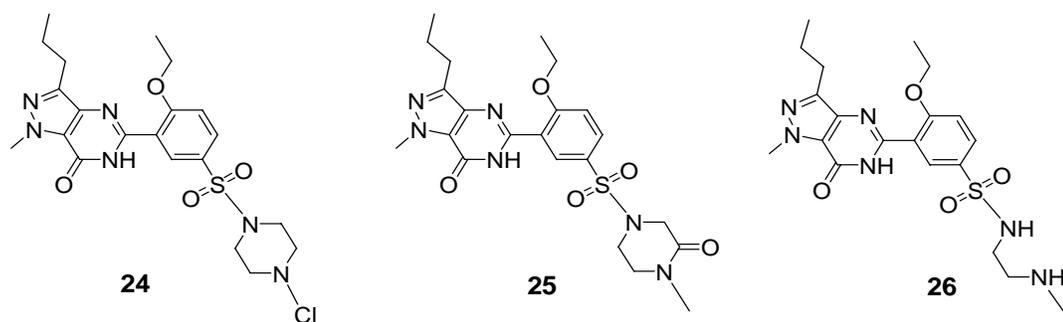


Sildenafil and tadalafil are two inhibitors of the phosphodiesterases 5 (PDE5) enzyme, which converts the cyclic guanosine 3', 5' monophosphate (cGMP) in 5' monophosphate guanosine (GMP), used in erectile dysfunction treatment. No literature data are available yet on finding of these drugs in STPs or in surface waters, but they are

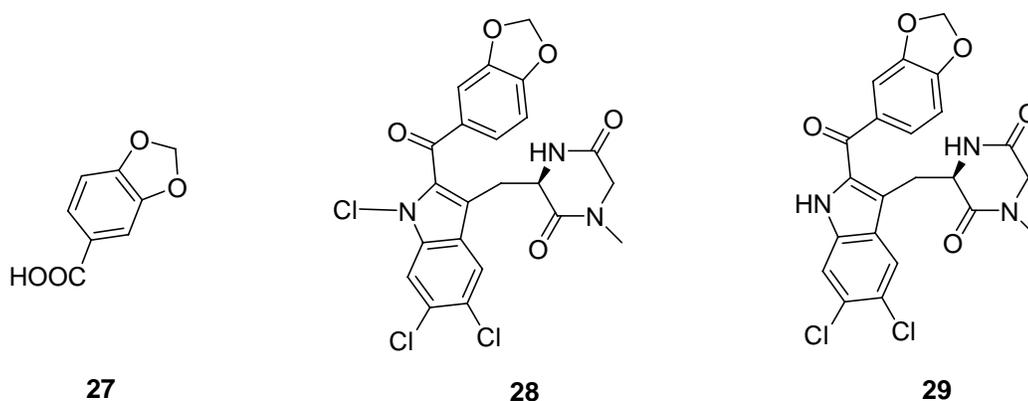
currently at the 32<sup>nd</sup> and 65<sup>th</sup> place in the American list of the most sold prescription drugs (<http://www.rxlist.com>).



Upon hypochlorite treatment, sildenafil showed to be highly reactive, it completely degraded in all chlorination experiments leading to formation of three products **24**, **25** and **26**. Product formation is due to oxidation of the amino function on the piperazinic ring. Two different iminium ions can be generated by  $H^\bullet$  extraction from the methylic group, which leads to the formation of product **24**, or by the  $\alpha$ -methylenes of the piperazinic group, which leads to the formation of products **25** and **26**.



Tadalafil gets completely transformed only pushing reaction conditions toward very strong hypochlorite excess (drug/hypochlorite 1:18 and 1:22) and long contact time (1h). In all the chlorination experiments we observed formation of product **27** while it is possible to isolate the other two products **28** and **29** only in strong excess conditions. These compounds are generated by excision of the bound between nitrogen and benzylic carbon followed by carbon oxidation. At the same time, chlorination processes of the aromatic ring and of the indolic nitrogen occur for compounds **28** and **29**.



*In summary*, in the course of this work, it has not been possible to identify a general transformation model for all functional groups. In agreement with literature data, we observed that primary and secondary amino groups are always subjected to N-chlorination processes while S-containing functions always show oxidation of this atom. Oxidative decarboxylation processes on the other hand do not follow a strict rule. Also in the case of tertiary amines reactivity is variable. In fact, while in the tamoxifen molecule, this group produces a stable N-oxide, in the case of ranitidine, generation of a cationic radical leads to formation of an aldehyde and in the case of sildenafil, the oxidation process leads to generation of three different products. This also shows that the reactivity of these functional groups depends on the complex chemical environment present in these molecules.

Evaluation of the environmental risk posed by drugs also comprises toxicity studies of the drug itself and of all its metabolites. In fact, even if environmental drug concentrations are in the range of (ng -  $\mu$ g)/L, that is values incapable of causing toxic effects on humans and on the other living beings, the risk linked to a continuous exposition should not be underestimated. Toxic effects depend in fact on different factors: dose, exposition length, administration way, characteristics of the exposed organism. These substances are therefore potentially capable of contaminating the environment, exercising local build-ups and bioaccumulation in aquatic vegetal and animal species and, through biomagnification of the food chain, on superior animals and humans.

The potential environmental impact of the parental compounds and of their products has been evaluated by phytotoxicological quantification assays or, in collaboration with the Life Science Department of the Second University of Naples, by acute and chronic toxicity, genotoxicity and mutagenicity assays on different aquatic organisms. This study combination is rare in literature but in the last years it is becoming of particular interest in Environmental Chemistry.

Chlorination mixtures and products subjected to phytotoxicity assays, performed accordingly to the procedure optimized by Macias et al., 2000, on the dicotyledon *Lactuca sativa* L. (Neapolitan cabbage) showed an inhibitory effect on germination and hypocotyl growth, as in the case of atenolol.

In the case of ranitidine and of its most abundant products, **11** and **12**, toxicological evaluations on some species of the trophic aquatic chain (acute and chronic toxicity, mutagenicity and genotoxicity) have shown that products are more toxic of the parental drug (acute and chronic toxicity tests) and that while the drug is mutagenic and genotoxic at high concentration, its derived products are capable of inducing a positive response at much lower concentration.

These toxicity data, even if preliminary, demonstrate that before considering a potential employment of wastewater effluents deriving from STP plants, both in agriculture and cycles for human consumption (potabilization cycles), it is necessary to verify quality of these waters and design processes able to eliminate, if present, these pollutants.

## Elenco pubblicazioni

- Della Greca M., Pinto G., Pistillo P., Pollio A., Previtiera L., Temussi F.; “Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae” *Chemosphere* **70**, 2047-2053 (2008).
- Della Greca M., Iesce M.R., Pistillo P., Previtiera L., Temussi F.; “Unusual products of the aqueous chlorination of atenolol” *Chemosphere* **74**, 730-734 (2009).
- Isidori M., Parrella A., Pistillo P., Temussi F.; “Effects of Ranitidine and its photoderivatives in the aquatic environment” *Environment International* **35**, 821-825 (2009).