

Prof. Giorgio Sartor

Inquinamento da farmaci

Prof. Elena Fabbri

*Laboratorio di Fisiologia e
Biochimica Ambientale, Ravenna*

Copyright © 2001-2014 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 0.1 – jan 2014

*Inquinanti emergenti: i residui
dei farmaci in ambiente*

Contaminanti emergenti?

da almeno 15 anni sappiamo che ci sono tracce di droghe nelle acque dei fiumi.....!!!

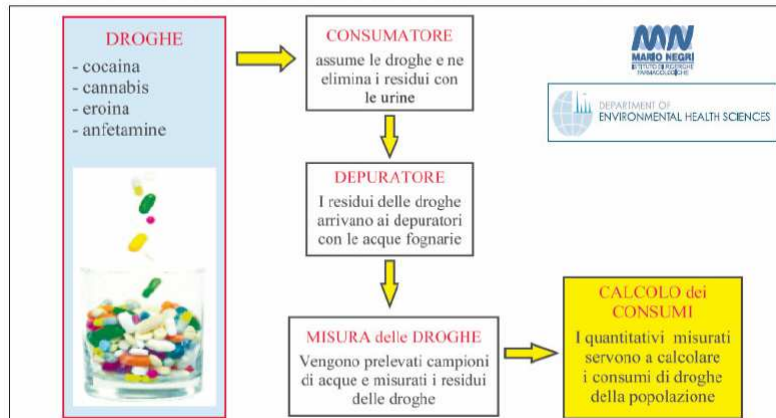
anche se il problema è stato sottovalutato.....

Emergenti = le sostanze potenzialmente tossiche per le quali non esiste ancora una precisa classificazione né limiti di legge.

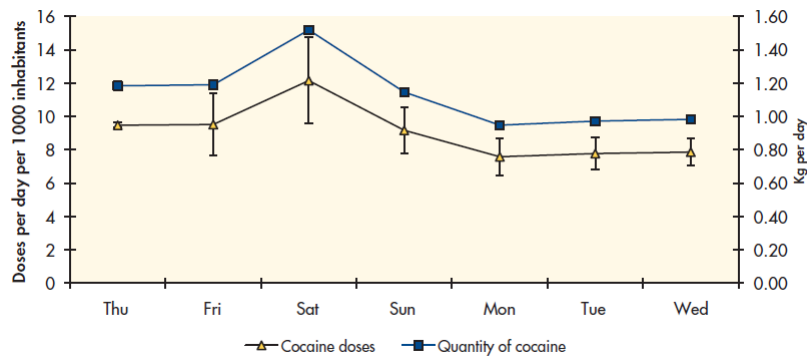
La Repubblica, 4 agosto 2005: Scoperte tracce di cocaina nel Po "Scorrono quattro chili al giorno"

Emergenti = le sostanze potenzialmente tossiche per cui non esiste ancora una precisa classificazione né limiti di legge.

IL PERCORSO DELLE DROGHE: DAL CONSUMATORE AL DEPURATORE



Cocaina



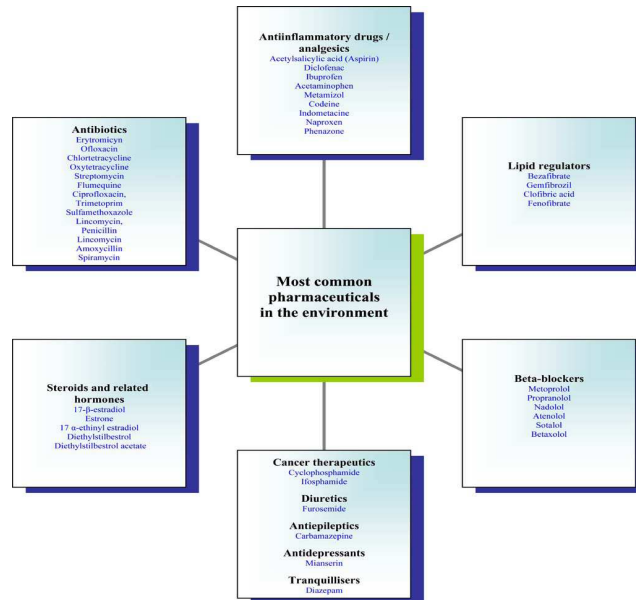
Monitoraggio giornaliero degli equivalenti di cocaina in ingresso nel depuratore di Milano Nosedo, che serve 1.25 milioni di abitanti.

I farmaci «leciti» acquistati a tonnellate per anno

Farmaci	Ton / anno
Carbamazepina	20
Diazepam	0.9
Fluoxetina	4.2
Ibuprofene	276.1
Naproxene	42.6
Diclofenac	32.3
Bezafibrato	4.0
Sulfmetossazolo	12.7
Eritromicina	8.1
Metoprololo	2.3
Etinilestradiolo	0.01



I più comuni farmaci ritrovati in ambiente

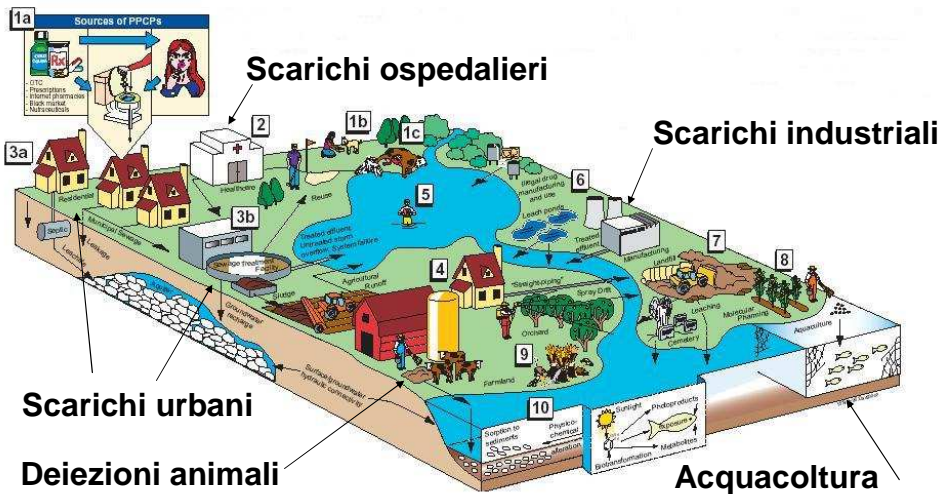


gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

7

Vie di introduzione nell'ambiente:

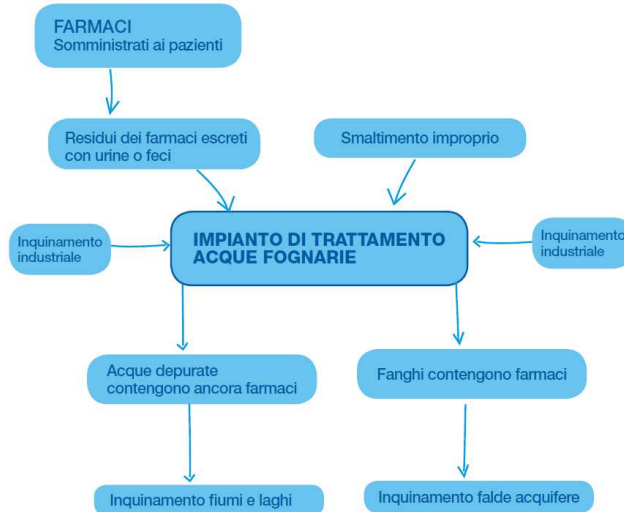


gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

8

I depuratori hanno un ruolo «centrale»



gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

9

... ma non sempre efficace

Farmaco	Effetto terapeutico	Impianto trattamento Germania	Impianto trattamento Brasile
ACIDO ACETILSALICILICO	ANALGESICO/ANTI-INFIAMMATORIO	81%	-
BEZAFIBRATO	REGOLATORE LIPIDICO	83%	27-50%
CARBAMAZEPINA	ANTIPILETTICO	7%	0%
ACIDO CLOFIBRICO	REGOLATORE LIPIDICO	51%	15-34%
DICLOFENAC	ANALGESICO/ANTI-INFIAMMATORIO	26%	-
17 α -ETINILESTRADIOLO	CONTRACCETTIVO ORALE	85%	-
GEMFIBROZIL	REGOLATORE LIPIDICO	69%	16-46%
IBUPROFENE	ANALGESICO/ANTI-INFIAMMATORIO	90%	22-75%

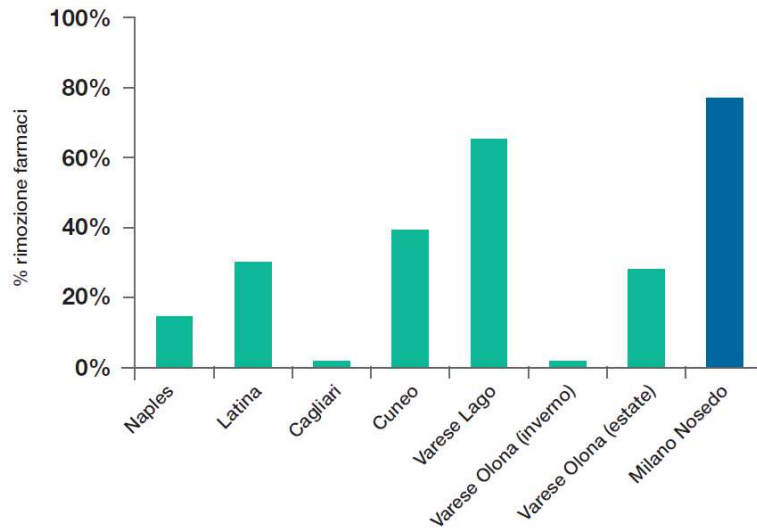
Le immissioni hanno una frequenza maggiore rispetto ai tempi di inattivazione dei composti, con il risultato di renderli pseudopersistenti!

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

10

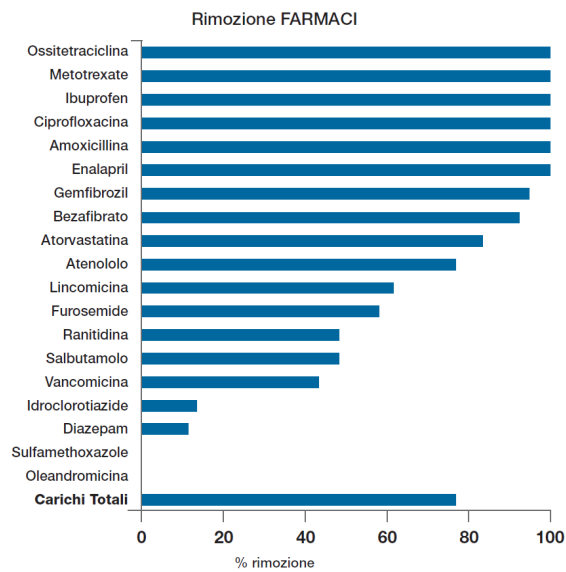
Esempi di depuratori in Italia



gs © 200

11

Media di 9 depuratori italiani



gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

12

Il depuratore di Milano Nosedo, uno dei più avanzati

Milano WWTP
trattamento biologico + disinfezione (acido peracetico)
Portata: 374.000 m³/d Popolazione residente: 1.250.000

RIMOZIONE 80-100%

Atenolol
Atorvastatine
Bezafibrate
Enalapril
Estrone
Gemfibrozil
Ibuprofen
Ketoprofen
Methotrexate
Naproxen

RIMOZIONE 30-80%

Ciprofloxacina
Clarythromycin
Dehydroerythromycin
Diclofenac
Furosemide
Lincomycin
Ranitidine
Salbutamol
Sulphamethoxazole

RIMOZIONE < 30%

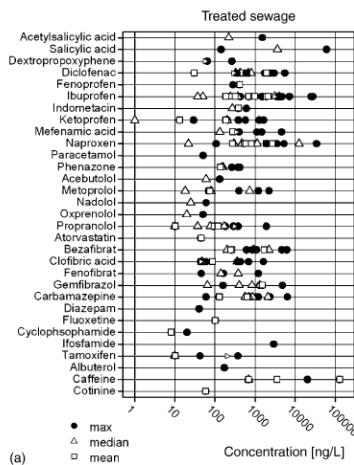
Hydrochlorothiazide
Ofloxacin
Vancomycin

NESSUNA RIMOZIONE

Carbamazepine
Cyclophosphamide
Diazepam
Demethyl-diazepam
Erythromycin

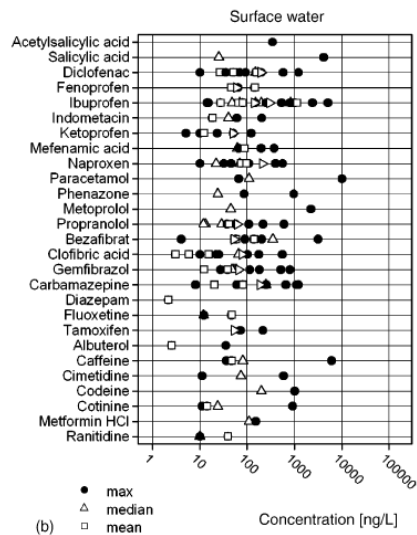
Farmaci nelle acque in uscita dai depuratori

Valori medi 100-10.000 ng/L



Farmaci nelle acque dei fiumi

Valori medi 10-1000 ng/L



gs © 2001-2014 ver 0.1

15

Farmaci nelle acque del Po

Farmaci	Fiume PO (7 stazioni) ng/L
Ofloxacina	37
Furosemide	67.2
Atenololo	41.7
Carbamazepina	34.2
Ibuprofene	17.4
Spiramicina	43.8
Bezafibrato	2.7
Eritromicina	15.9
Lincomicina	248.9
Claritromicina	20.3
Etinilestradiolo	0
Cocaina	0.8
Benzoylgonina	5.1
Codeina	1.9
Metadone	0.8
Anfetamina	tracce
Morfina	tracce

Zuccato et al., Water Res. 2008

Zuccato et al., Environ Sci & Pollut Res 2006

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

16

Farmaci in ambiente marino costiero (1-200 ng/L)

Sito	Caffeina ng/L	DEET ng/L	Ibuprofene ng/L	Ibu-OH ng/L	Ibu-CX ng/L	Ibu_tot ng/L
North Sea						
Brevika Harbour 1	44	0.5	0.3	1.3	3.6	5.2
Brevika Harbour 2	56	0.5	0.7	1.5	5.3	7.5
Central Harbour	87	0.5	0.07	0.8	7	7.8
Vengsoyfjorden	9	4.9	nd	nd	nd	nd
Kvaldsund	7	4.3	nd	nd	nd	nd

Coste Norvegia, Weigel et al., 2004

Sito	Cefalexina ng/L	Amoxicillina ng/L	Ofloxacina ng/L	Norfloxacina ng/L	Eritromicina ng/L	Tetraciclina ng/L
VICTORIA HARBOUR						
Wan Chai	139	76	145	27	81	151
Causeway bay	57	39	50	17	39	nd
Kwun Tong	493	29	634	27	1900	313
Shau Kei Wan	15.5	2.9	12	6.1	17	nd
Central	8.6	1.9	9.9	7.6	25	nd

Baia di Hong Kong, mod da Minh et al., 2009

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

17

I farmaci nei suoli

U.S. Geological Survey (USGS) riporta che i farmaci presenti nelle acque reflue usate per l'irrigazione persistono nei suoli per molti mesi. Sono circa 30 i farmaci ritrovati, fra cui:

caffeine	stimolante
carbamazepina	antiepilettico
cimetidina	antiulcera
codeina	antidolorifico
fluoxetina	antidepressivo
gemfibrozil	anticolessterolemia
miconazolo	antipiretico
trimetoprim	antibiotico

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

18

Farmaci nei suoli agricoli

farmaco	terapia	mg/kg
tetraciclina	antibiotico	40
lincomicina	antibiotico	98
ossitetraciclina	antibiotico	305
sulfadiazina	antibiotico	0.8
sulfametazina	antibiotico	2
tetraciclina	antibiotico	295
trimetoprin	antibiotico	0.5

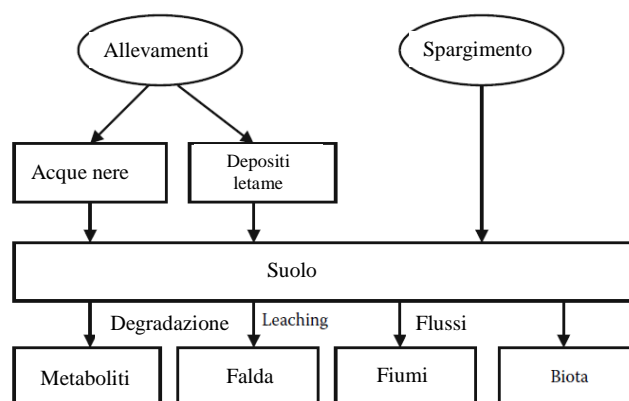
Boxall, 2008

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

19

Origine dei farmaci nei suoli agricoli



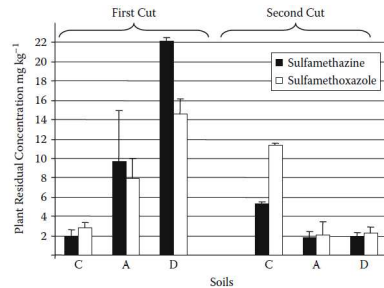
Vie di ingresso, destino e diffusione dei farmaci ad uso veterinario nei suoli agricoli

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

20

Uptake di farmaci



Uptake di antibiotici sulfamidici assorbiti da erba medica

Altri dati: fluoxetina 280 ng/ml nel suolo = concentrazione di 0.49 μ g/g ww nel fiore (0.26 μ g /g ww) nelle foglie di *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cavolfiore)

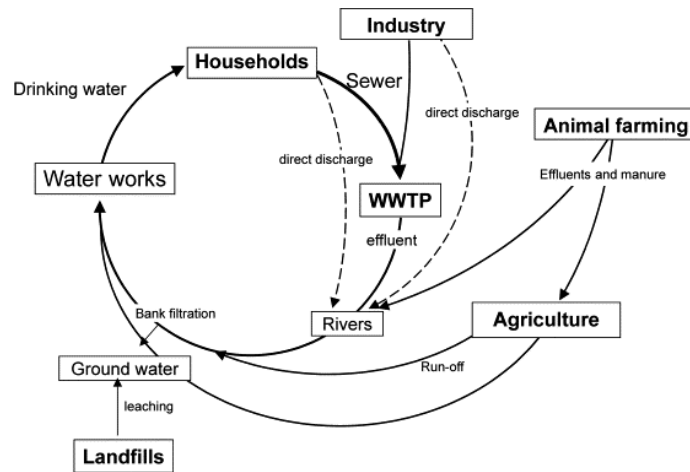
17 α -ethynylestradiol (EE2) nel fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) coltivato nella sabbia: fattore di bioconcentrazione (BCFs) di EE2 1424 nelle radici e 55 nelle foglie.

Farmaci nelle acque potabili

Uso terapeutico	Farmaco	ng/L acqua potabile	Paese
antibiotico	Triclosan	734	USA
antiepilettico	Carbamazepina	14-258	USA
	Pirimidone	40	Francia
antidepressivo	Diazepam	23.5	Italia
antineoplastico	Bleomicina	13	UK
contrasto raggi X	Diatrizoato	1200	Germania
regolatori lipidici	bezafibrato	27	Germania
	acido clofibrico	50-270	Germania
	gemfibrozil	70	Canada
NSAID-analgesici	Diclofenac	6-35	Germania
	Ibuprofen	3-1350	Germania - USA
	Ketoprofen	8	Finlandia
oppioidi-analgesici	Codeina	30	USA
psico stimolanti	Caffeina	22.9-119	Francia-USA

Modificato da Mompelat et al., 2009.

Quanto eliminato può venirci restituito ?



gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

Mompelat et al., Env Int 2009

23

Tossicità dei farmaci ambientali

Valutazione mediante impiego di **test standard** in accordo linee guida OECD, USEPA, ISO

Organismi analizzati: alghe, zooplankton, piccoli invertebrati, pesci (uova/larve).

Endpoint valutati: crescita, riproduzione, mortalità.

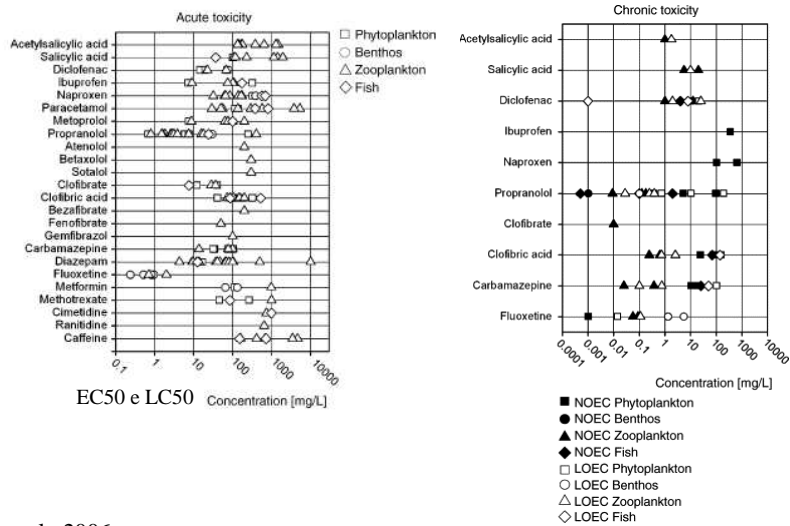


gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

24

Concentrazioni attive nei test di tossicità = mg/L



Fent et al., 2006

gs © 2001-2014 Ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

25

Test standard di tossicità

le concentrazioni attive sono
100-1000 o più volte maggiori di
quelle ambientali

probabilità non significativa di avere effetti
tossici

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

26

Esperienze già fatte....

17 α - ETINILESTRADIOLO, contraccettivo orale sintetico

A concentrazioni ambientali di 1 ng/L

pesci con gonadi contenenti tessuti maschili e femminili, e/o dotti riproduttivi femminili e con livelli alti di vitellogenina in conseguenza della femminilizzazione dei pesci maschi



gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

27

e più recenti... GEMFIBROZIL

Regolatore lipidico della famiglia dei fibrati

A concentrazioni ambientali di 1,5 μ g/L

Abbassamento del livello del Testosterone al 50%, in quanto il Gemfibrozil, abbassando il livello di colesterolo, agisce indirettamente sulla sintesi del Testosterone



Il pesce *Carassius auratus* ha i recettori per il Gemfibrozil

Mimeault et al., 2005

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

28

..... DICLOFENAC

Farmaco anti-infiammatorio non steroideo

A concentrazioni
ambientali di 1.2
 $\mu\text{g/L}$



Alterazione cellulare sia nei
reni che nelle branchie,
dovuto al blocco nella
produzione di prostaglandine

Il teleosteo *Oncorhynchus
mykiss* ha i recettori per il
Diclofenac

Hoeger et al., 2005

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

29

occorre tener presente che i farmaci
non sono “classici” inquinanti

- sono stati disegnati per avere effetti biologici quanto più specifici possibile e a basse concentrazioni, con eventuali effetti collaterali ad alte concentrazioni.
- non è possibile escludere effetti sub-letali a basse concentrazioni negli organismi acquatici o terrestri, se possiedono bersagli omologhi a quelli umani.

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

30

Linee guida ?

La European Medicines Agency (EMA) riconosce che
Non è possibile compiere studi estensivi sugli effetti
dei farmaci
d'altra parte
non è possibile applicare un limite ambientale per
residui di farmaci **"molto specifici e molto attivi"**,
che potrebbero avere effetti avversi per l'ecosistema
a concentrazioni estremamente basse.

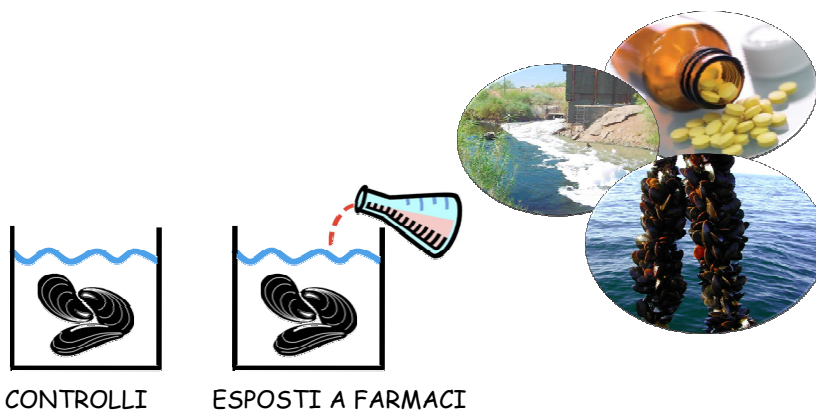
*La ricerca può indicare quali sono i
farmaci "molto specifici e molto attivi"*



The mode of action model

- Meccanismo d'azione
- Omologia del bersaglio dei farmaci nell'Uomo e negli organismi in ambiente
- Identificazione del meccanismo fisiologico alterato e sua importanza

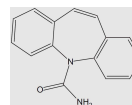
I mitili come sentinelle ambientali



➤ **Effetti di tossicità generica**

➤ **Interazioni con bersagli specifici**

La carbamazepina

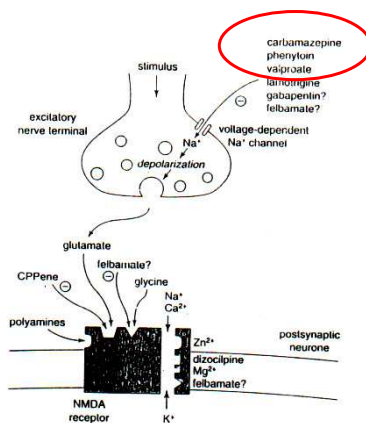


- UTILIZZATA NEL TRATTAMENTO DELL'EPILESSIA, PER I DISTURBI MANIACO DEPRESSIVI E PER LE NEURALGIE DEL TRIGEMINO (CA. 23 TON/ANNO)
- LE PERCENTUALI DI RIMOZIONE NEGLI IMPIANTI DI TRATTAMENTO VARIANO DALLO 0% AL 9%
- NOTEVOLE PERSISTENZA IN AMBIENTE (100 giorni)

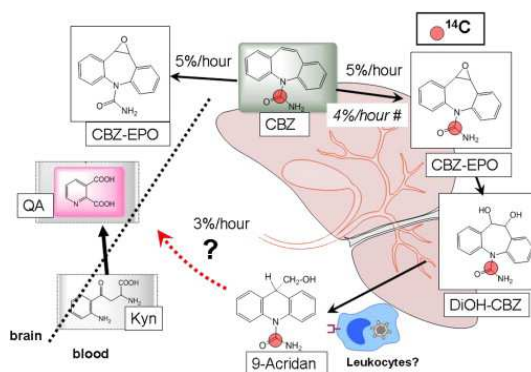
CARBAMAZEPINA

Blocca canali Na-voltaggio dipendenti, in questo modo riduce l'eccitabilità neuronale

PARTE degli effetti avvengono per inibizione dell'adenilato ciclasi e quindi riduzione dei livelli di cAMP

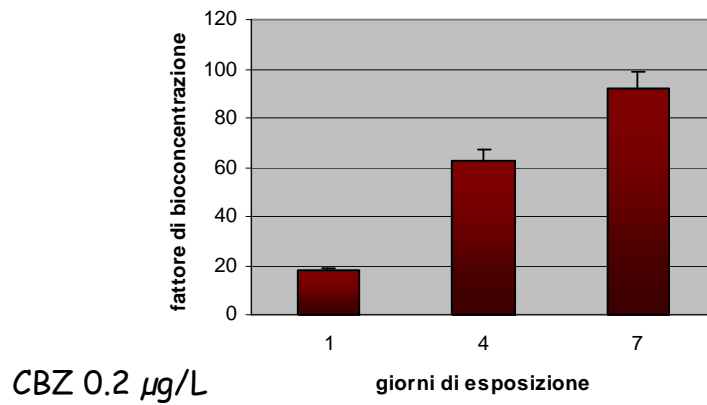


SOMMINISTRATA AD ALTE DOSI: PAZIENTI MONITORATI PER RISCHIO DI TOSSICITA' EPATICA



Il fegato è l'organo di principale metabolismo della carbamazepina

La CARBAMAZEPINA viene assorbita dai tessuti dei molluschi

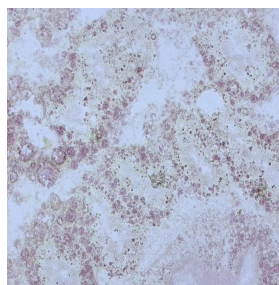


gs © 2001-2014 ver 0.1

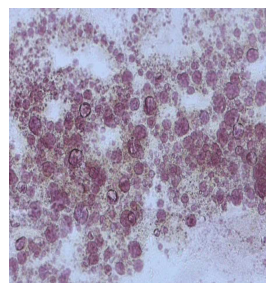
R05 - Inquinamento da farmaci

37

Integrità delle membrane dei lisosomi nella **ghiandola digestiva** dei mitili



40 min: Organismo in ottimo stato di salute



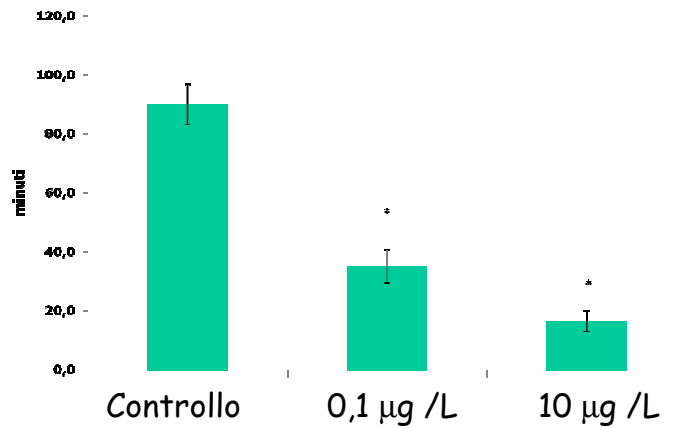
5 min: Organismo in pessimo stato di salute (CBZ)

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

38

CARBAMAZEPINA e integrità delle membrane dei lisosomi nell'emolinfa



gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

39

La carbamazepina

Induce stress ossidativo nei mitili

- Riduce la stabilità delle membrane lisosomiali
- Aumenta la produzione di malondialdeide
- Aumenta l'accumulo di lipofuscine
- Stimola l'attività degli enzimi antiossidanti

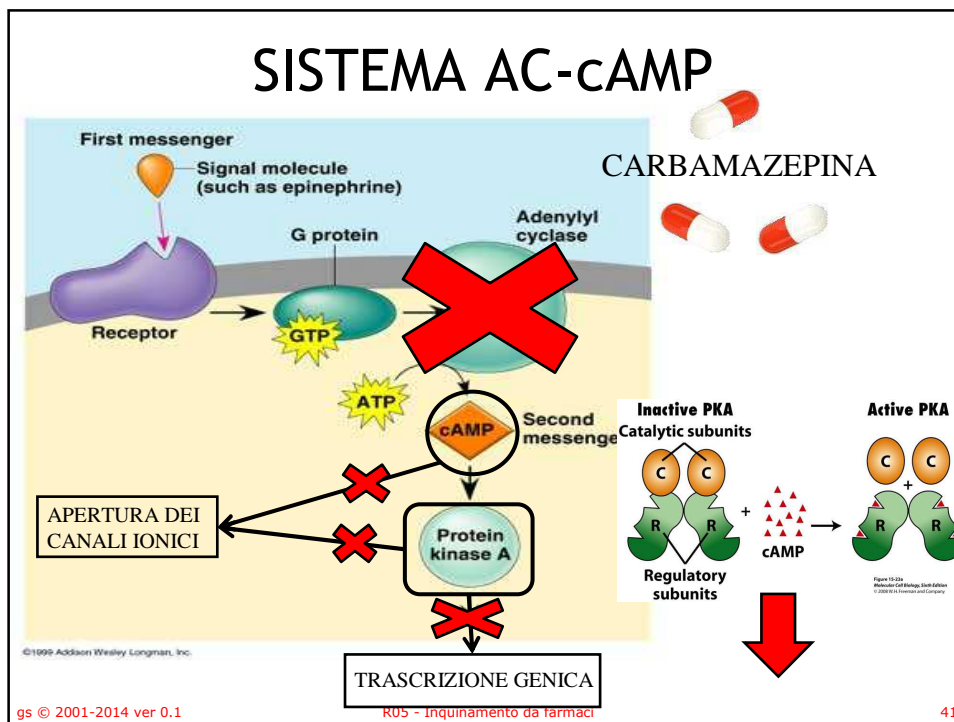
Trova nei mitili gli stessi bersagli attraverso cui svolge l'effetto terapeutico?

Lab. Fisiologia e Biochimica Ambientale, Ravenna

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

40



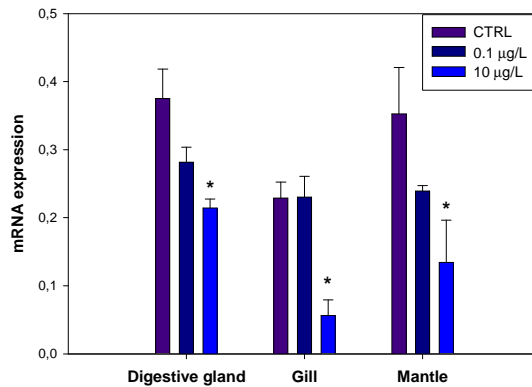
Risultati sperimentali (Aquat Toxicol 2009)

- La Cbz a concentrazioni ambientali riduce i livelli di cAMP nei mitili
- La Cbz a concentrazioni ambientali riduce l'attività della PKA nei mitili
- La Cbz a concentrazioni ambientali riduce l'espressione genica della P glicoproteina essenziale per estrudere dalle cellule gli xenobiotici. PgP è nota per essere sotto il controllo della PKA.

CARBAMAZEPINA: effetti mirati ai bersagli specifici nei mitili

Trasportatore di membrana (P glicoproteina) per la detossificazione (espressione genica)

Questo effetto rappresenta una diminuzione delle difese del mitilo contro gli xenobiotici



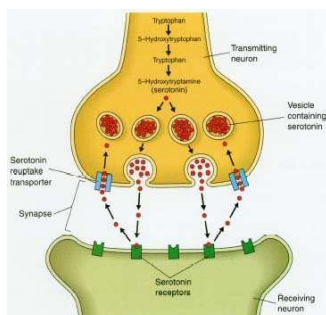
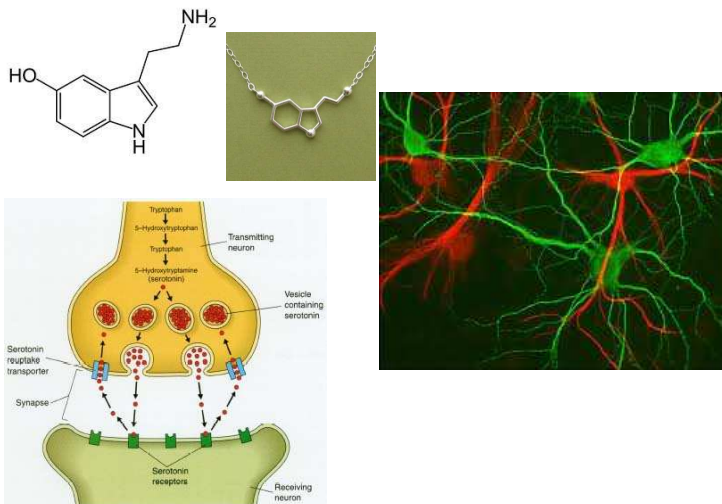
La fluoxetina

FARMACO ANTIDEPRESSIVO

Ma prescritto anche per i trattamenti compulsivi del comportamento e per i disturbi alimentari e di personalità.

La fluoxetina è un farmaco messo in commercio quasi 20 anni fa, ed è il principio attivo del Prozac

MECCANISMO D'AZIONE DELLA FLUOXETINA

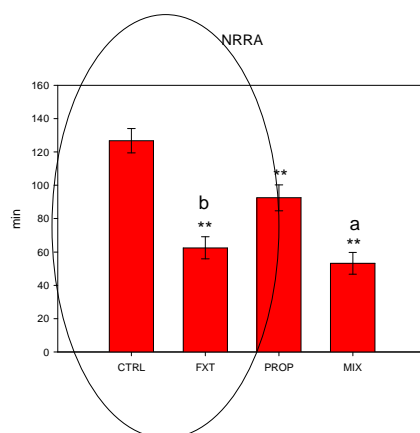


gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

45

La fluoxetina riduce la integrità delle membrane lisosomiali nei mitili



gs © 2001-2014 ver 0.1

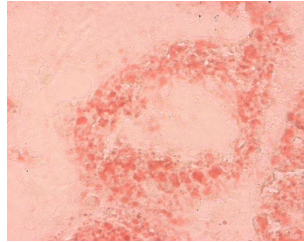
R05 - Inquinamento da farmaci

46

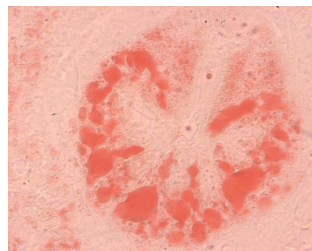
Lipidi neutri insaturi

Sezioni di ghiandole digestive di mitili

In evidenza i lipidi neutri, il cui aumento **segno di alterato metabolismo**



Mitilo di controllo

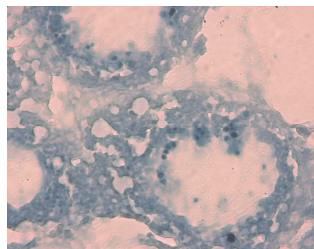


Mitilo esposto a fluoxetina

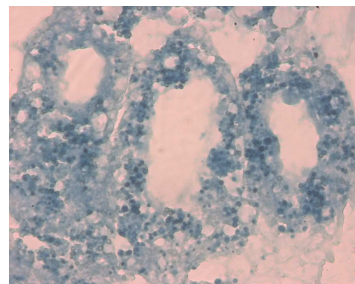
Lipofuscine

Sezioni di ghiandole digestive di mitili

In evidenza le lipofuscine (granuli scuri) il cui aumento è **segno di ridotta capacità di digerire ed eliminare sostanze**

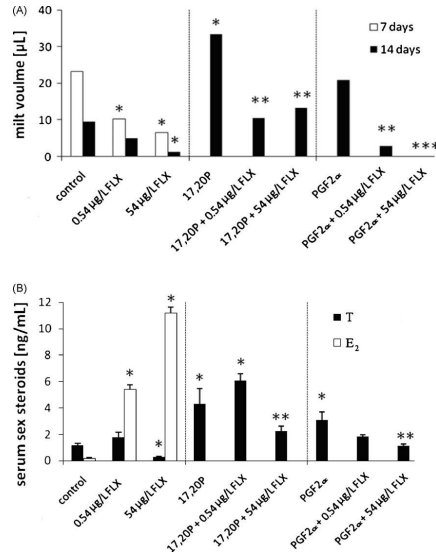


Mitilo di controllo



Mitilo esposto a fluoxetina

Fluoxetina



Individui maschili di trota trattati con fluoxetina

- Dopo 14gg, significativamente ridotto il volume di masse spermatiche, sia basale che dopo stimolazione con feromoni
- Ridotti i livelli di testosterone
- Aumento dei livelli di estradiolo e della espressione dei recettori per l'estradiolo nel fegato.

Moon et al., 2009

A che punto siamo?

- I residui dei farmaci alle concentrazioni ambientali possono:
- Indurre tossicità negli organismi acquatici
- Alterare risposte fisiologiche importanti, ad es. operare come interferenti endocrini.

Ma NON possiamo eliminare l'uso dei farmaci!!



Depuratori



Assorbimento su fanghi : poco attivi su farmaci che a pH neutro sono ionizzati (fibrati, molti NSAID); attivo su estradiolo.

Biodegradazione: possibile per molti farmaci, in genere molto lenta

Le nuove frontiere

Bioreattori a membrana: fanghi biologicamente attivi + separazione per filtrazione su membrana

Ossidazione avanzata mediante ozono e H₂O₂, con l'aggiunta o meno di UV

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

51
51

- **Non ci sono limiti ambientali**
- **Non ci sono linee guida ben definite**
- **MA gli studi scientifici segnalano «anomalie»**

PERTANTO vengono intrapresi processi "volontari"

- **Laboratori di ricerca operano per ulteriori approfondimenti**
- **Aziende che si sono attivate 1) per assicurare la qualità dell'acqua potabile e 2) per adeguarsi in vista di future linee guida**

gs © 2001-2014 ver 0.1

R05 - Inquinamento da farmaci

52

Azioni di mitigazione

Attivate nel complesso solo in alcuni Paesi
(nord America e Nord Europa)

- Limiti ambientali per carbamazepina, diclofenac e acido clofibrico
- Disposal regolato dei farmaci
- Eco label: classificazione dei farmaci in base alle loro azioni caratteristiche ecotossicologiche e rischi ambientali
- Promozione della green-pharmacy
- Aziende invitate a non "regalare" farmaci
- Medici invitati a tener conto della ecocompatibilità dei farmaci al momento della prescrizione

- [An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels.](#)
- Franzellitti et al Aquat Toxicol. 2014 in press
- [The mode of action \(MOA\) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on Mytilus galloprovincialis.](#)
- Franzellitti S, et al Aquat Toxicol. 2013 140-141:249-56.
- [Cyclic-AMP mediated regulation of ABCB mRNA expression in mussel haemocytes.](#)
- Franzellitti S e Fabbri E. PLoS One. 2013 12;8(4):e61634.
- [The \$\beta\$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, Mytilus galloprovincialis.](#)
- Franzellitti S, et al Aquat Toxicol. 2011 101(2):299-308.
- [Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel Mytilus galloprovincialis.](#)
- Martin-Diaz L, et al Aquat Toxicol. 2009 94(3):177-85.

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questa presentazione è di proprietà della Prof. Elena Fabbri responsabile del Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale, Ravenna
- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna – Alma Mater

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it