

# **Valutazione del rischio chimico**

CdL Magistrale Interateneo in  
Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio  
Università di Udine e Università di Trieste

CdL Magistrale in Chimica  
Università di Trieste

Docente  
Pierluigi Barbieri

**SSD Chimica dell'ambiente e dei beni culturali, CHIM/12**

# *Valutazione del rischio chimico*

*Processo chimico*



*(Emissioni)*



*(Dispersione  
Trasferimenti di fase  
trasformazioni ambientali)*



*Esposizione / PEC*



***Valutazione  
del rischio***

*Valutazione degli **effetti** dell'esposizione  
a sostanze singole e a miscele /  
NOAEC /tossicologia*



# Valutazione della tossicità per la valutazione del rischio per la salute umana (RAoC cap.6)

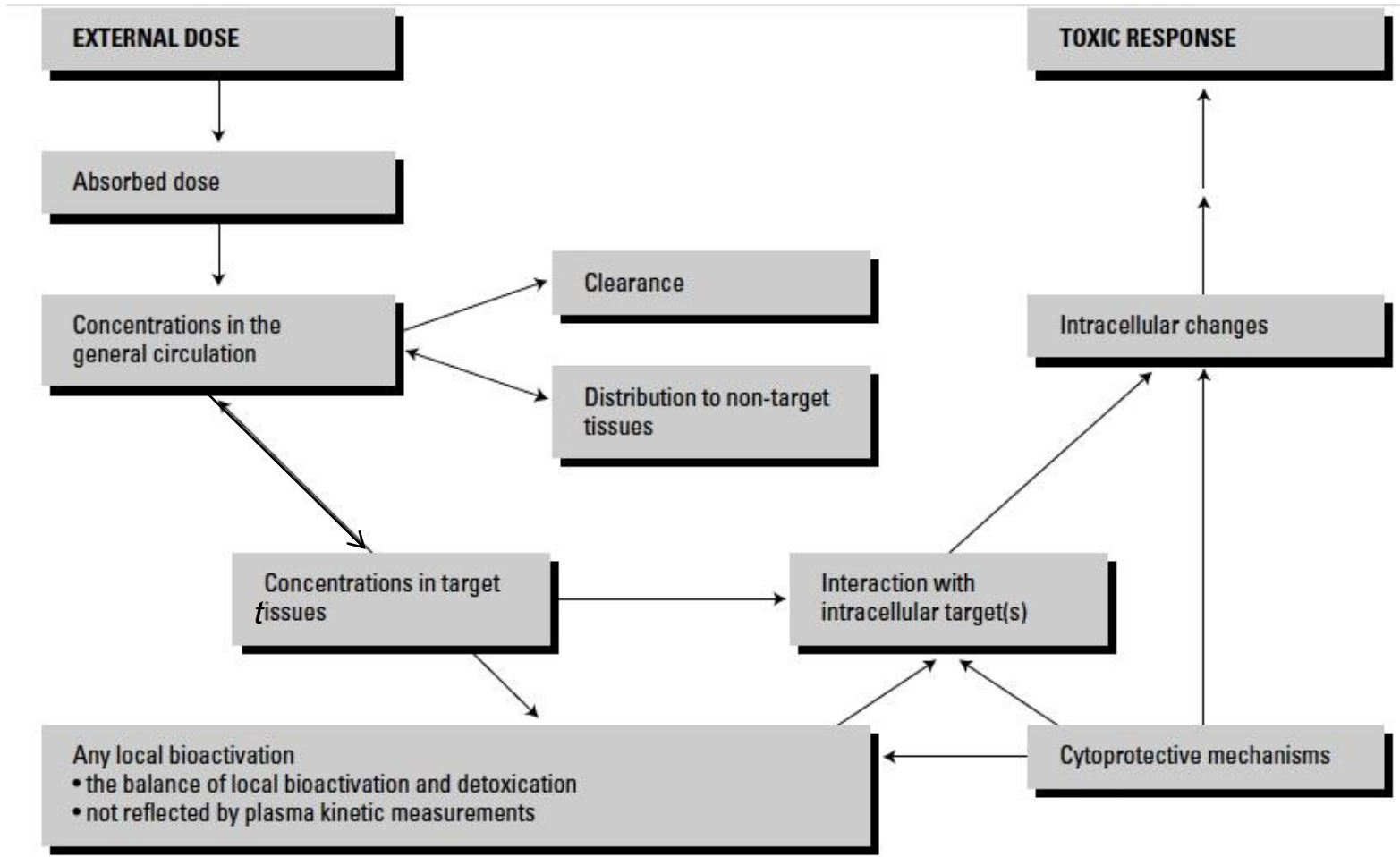
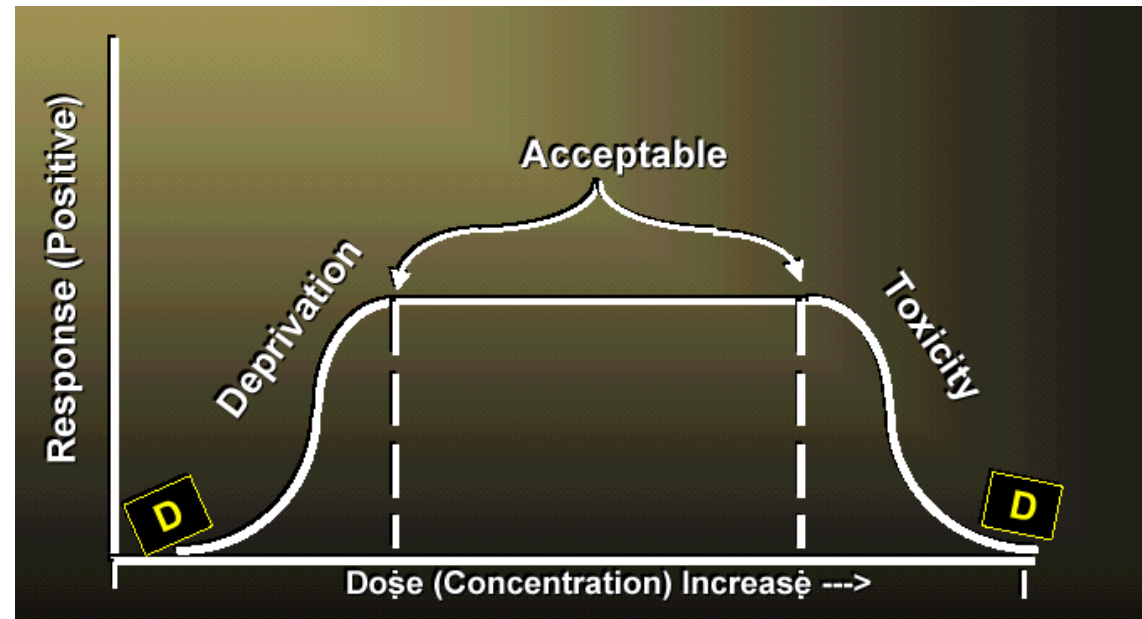


Figure 6.1. Processes leading to the generation of a toxic response [2].  
 Note: "Concentrations" refers to the relevant active form delivered by the general circulation and may be the parent compound or an active metabolite produced in another tissue and delivered to the target tissue or organ

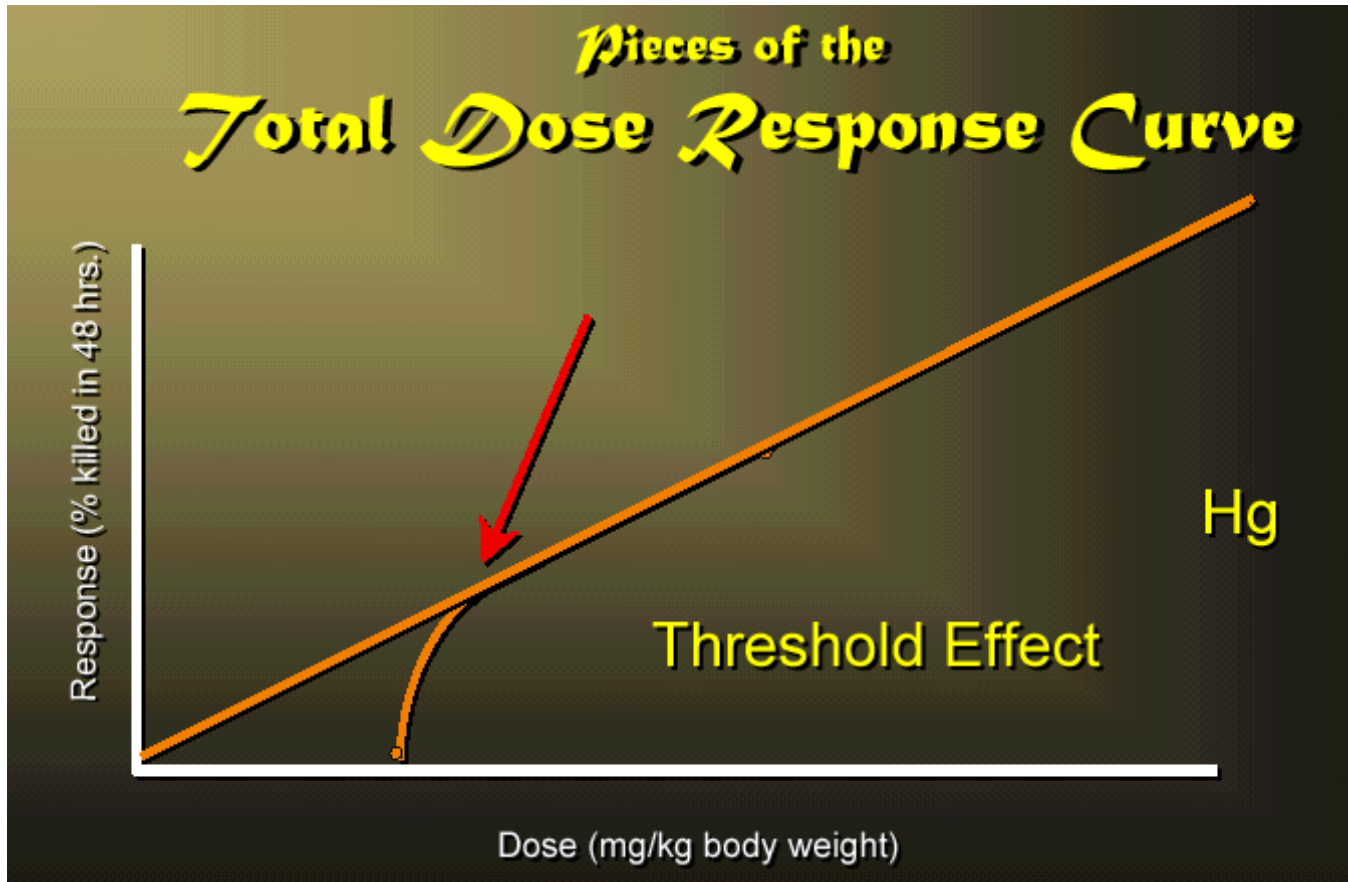
# Tossicologia: relazioni dose-risposta

- a) Livello minimo d'effetto,
- b) sensibilità di organismo a incrementi di tossico e
- c) livelli per cui effetto definitivo (esito o *endpoint* - es. morte, inibizione di movimento, etc.) accade per la maggior parte (es. mediana, n-mo percentile) di organismi esposti.

Per nutrienti minerali esistono range ottimali



Es.: relazione dose-risposta per valutazione di mortalità di organismi a seguito di esposizione a sostanza con soglia di effetto (relazione lineare per un tratto)



# Tossicologia – relazioni dose risposta

## Relazioni dose-risposta

*Risposta fisiologica rilevata*

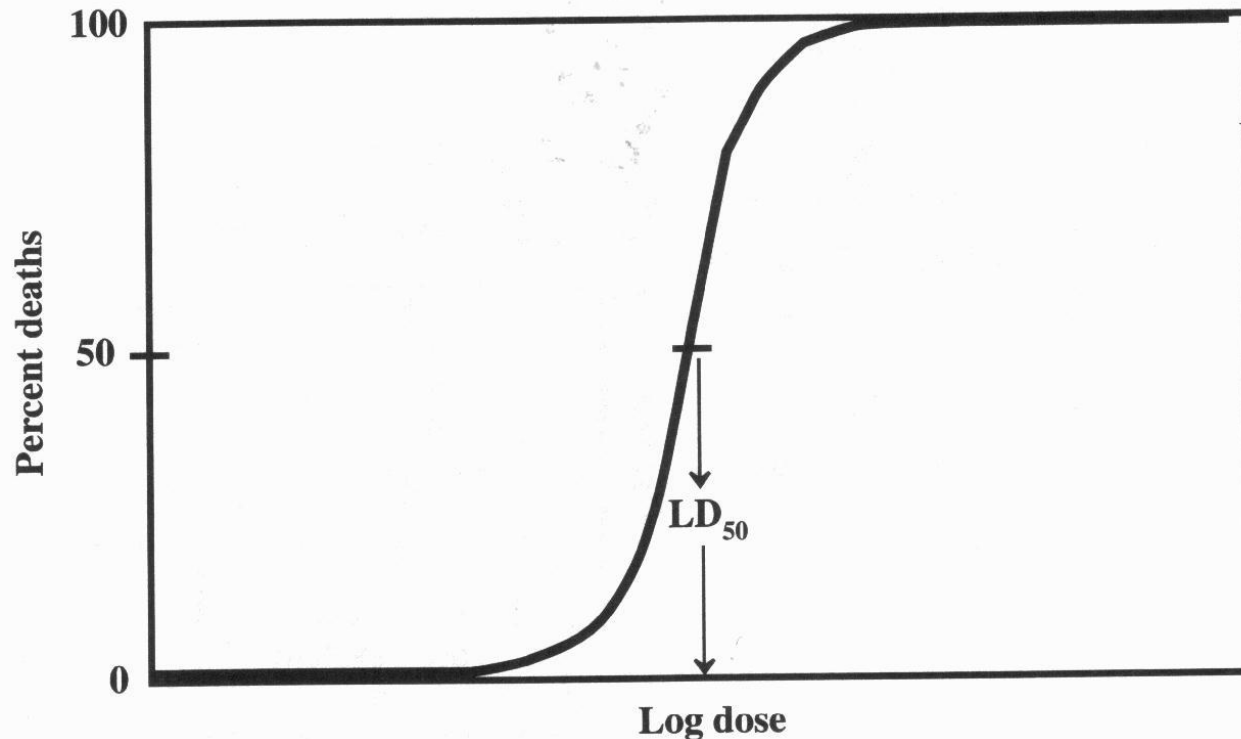


Illustration of a dose–response curve in which the response is the death of the organism. The cumulative percentage of deaths of organisms is plotted on the y axis. Although plotting log dose usually gives a better curve, with some toxic substances it is better to plot dose.

# Tossicologia – tossicità relative

## Dose letale stimata

per umani (in mg/kg)

(considera però

anche effetti non letali)

## Tossicità acuta

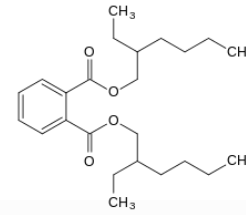


Table 6.1 Toxicity Scale with Example Substances<sup>a</sup>

Toxic Substance	Approximate LD <sub>50</sub>	Toxicity Rating
DEHP <sup>b</sup>	— 10 <sup>5</sup>	1. Practically nontoxic, > 1.5 × 10 <sup>4</sup> mg/kg
Ethanol	— 10 <sup>4</sup>	
Sodium chloride	— 10 <sup>3</sup>	2. Slightly toxic 5 × 10 <sup>3</sup> – 1.5 × 10 <sup>4</sup> mg/kg
Malathion	— 10 <sup>3</sup>	
Chlorane	— 10 <sup>2</sup>	3. Moderately toxic 500–5000 mg/kg
Heptachlor	— 10 <sup>2</sup>	
Parathion	— 10	4. Very toxic 50–500 mg/kg
TEPP <sup>c</sup>	— 1	
Nicotine	— 1	5. Extremely toxic 5–50 mg/kg
Tetrodotoxin <sup>d</sup>	— 10 <sup>-1</sup>	
	— 10 <sup>-2</sup>	6. Supertoxic <5 mg/kg
TCDD <sup>e</sup>	— 10 <sup>-3</sup>	
	— 10 <sup>-4</sup>	
Botulinus toxin	— 10 <sup>-5</sup>	

<sup>a</sup> Doses are in units of mg of toxicant per kg of body mass. Toxicity ratings on the right are given as numbers ranging from 1 (practically nontoxic) to 6 (supertoxic), along with estimated lethal oral doses for humans in mg/kg. Estimated LD<sub>50</sub> values for substances on the left have been measured in test animals, usually rats, and apply to oral doses.

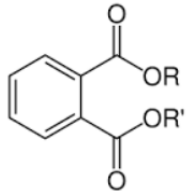
<sup>b</sup> Bis(2-ethylhexyl)phthalate.

<sup>c</sup> Tetraethylpyrophosphate.

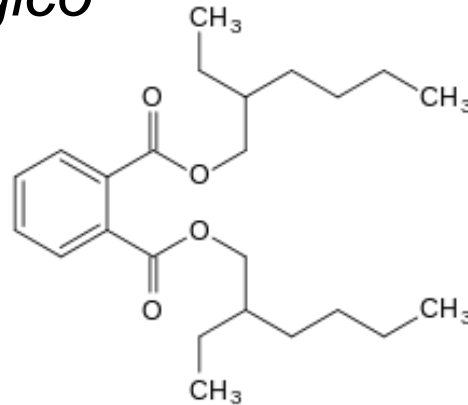
<sup>d</sup> Toxin from pufferfish.

<sup>e</sup> TCDD represents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, commonly called “dioxin.”

## Esempio di altro endpoint tossicologico



*DEHP*  
*bis (2-etilesil)ftalato*



[https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dehp\\_echa\\_review\\_report\\_2010\\_6\\_en.pdf/ce8e254f-3371-4c8b-8b92-865962bc5424](https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dehp_echa_review_report_2010_6_en.pdf/ce8e254f-3371-4c8b-8b92-865962bc5424)

Reproductive toxicant category 1B adverse effects on sexual function and fertility or on development (Table 3.1) or reproductive toxicant category 2 with R60 (May impair fertility) or R61 (May cause harm to the unborn child) (Table 3.2) listed in Appendix 6

[https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/clp\\_en.pdf/58b5dc6d-ac2a-4910-9702-e9e1f5051cc5](https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/clp_en.pdf/58b5dc6d-ac2a-4910-9702-e9e1f5051cc5)

3.7.2. Classification of substances for reproductive toxicity

[https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenih\\_r\\_o\\_047.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_047.pdf)

(leggere Abstract)



# Tossicologia – tossicità relative

paragone tra criteri di

## tossicità acuta

*La tossicità acuta si riferisce agli effetti avversi che si verificano in breve tempo (di solito entro 14 giorni) dopo la somministrazione di una singola dose (o esposizione a un determinato dose o concentrazione) di una sostanza di prova, o più dosi date entro 24 ore.*

*La DL50 è definita come l'espressione derivata statisticamente di una dose singola che si prevede sia letale per il 50% degli animali testati*

Table 6.3. Some criteria for the classification of chemicals on the basis of LD50 values from acute oral toxicity data expressed as mg/kg<sub>bw</sub>

<i>United Nations</i>	toxic 1	toxic 2	toxic 3		
Solids	< 5	< 50	< 500		
Liquids	< 5	< 50	< 2000		
<i>World Health Organization</i>	extremely hazardous	highly hazardous	moderately toxic	slightly toxic	
Solids	< 5	< 50	< 500	< 5000	
Liquids	< 20	< 200	< 2000	< 2000	
<i>European Communities</i>	very toxic	toxic	harmful		
	< 25	< 200	< 2000		
<i>USA</i>	supertoxic	highly toxic	very toxic	moderately toxic	slightly toxic
	< 5	< 50	< 500	< 5000	< 15000

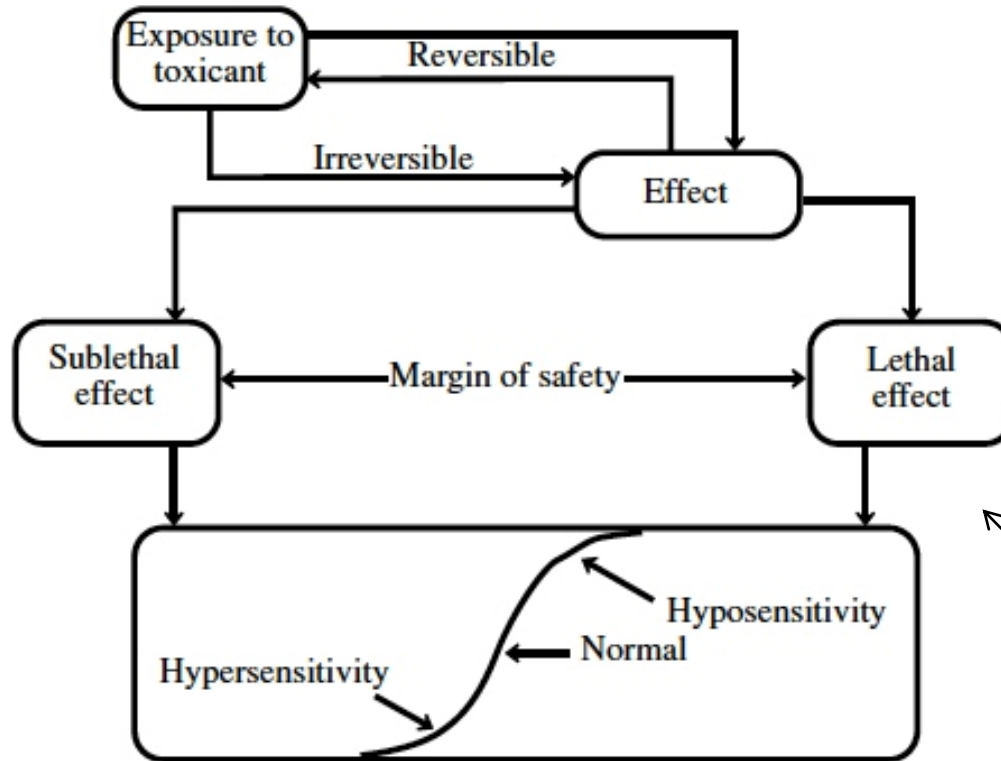
*Le  $DL_{50}$  hanno un valore limitato nell'esprimere i pericoli per l'uomo.*

*Questo è perché la morte a breve termine a seguito dell'esposizione (ambientale) ad una sostanza tossica è un effetto irreversibile relativamente raro.*

*Maggiormente preoccupanti sono gli **effetti subletali** che sono spesso reversibili, come le allergie e difetti congeniti, **o effetti** che possono essere **letali ma che non sono acuti** come la cancerogenesi.*

# Tossicologia –Reversibilità e sensibilità

*Iper e iposensibilità, risposte “normali”*



Effects of and responses to toxic substances.

*Effetti irreversibili, permangono dopo l'eliminazione del tossico dall'organismo*

**MoS** è la differenza tra concentrazione di esposizione e conc. letale

*Reazioni allergiche indotte - penicillina  
Tolleranza - es Cd<sup>2+</sup> metallothioneine*

//

**Tossicologia non cinetica:** effetti dannosi di una specie chimica che si verificano nel sito di esposizione ( $\text{HNO}_3$  sulla pelle)

Specie non metabolizzate / trasportate / eliminate dal corpo

Caratteristiche della specie

Sito (area e durata) di esposizione

(Anche nota come

t. non metabolica o t. non farmacologica)

//

# Tossicologia cinetica: Specie trasportate / metabolizzate

## Veleni sistemici, possono attraversar membrane e agire su recettori

Quando consideriamo la pericolosità di una **sostanza** assumiamo che gli effetti avvengano per **interazione tra essa ed un sito recettore**. Si ha una risposta solo se un quantitativo sufficiente della specie o di un suo metabolita attivo raggiunge il recettore. Ciò evidenzia la rilevanza dell'informazione sui processi di **assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)**, molto studiati in farmacologia, che determinano il destino all'interno del corpo e le dosi interne al sito bersaglio.

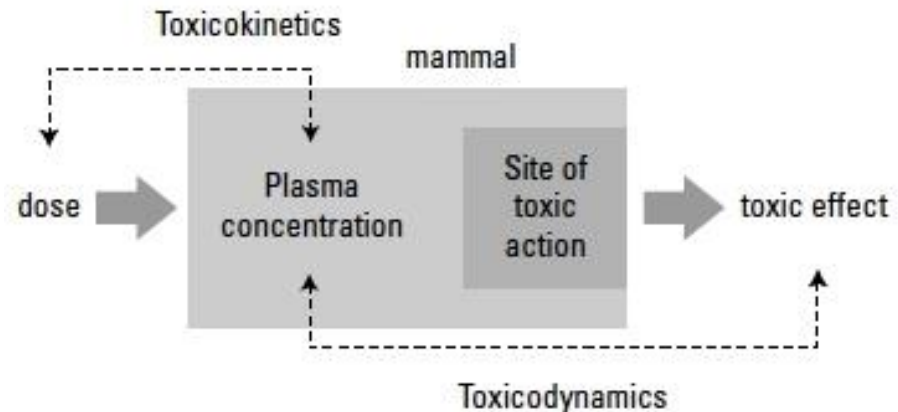


Figure 6.2. Toxicokinetics

# ADME

# Absorption

*Es. ingestione*

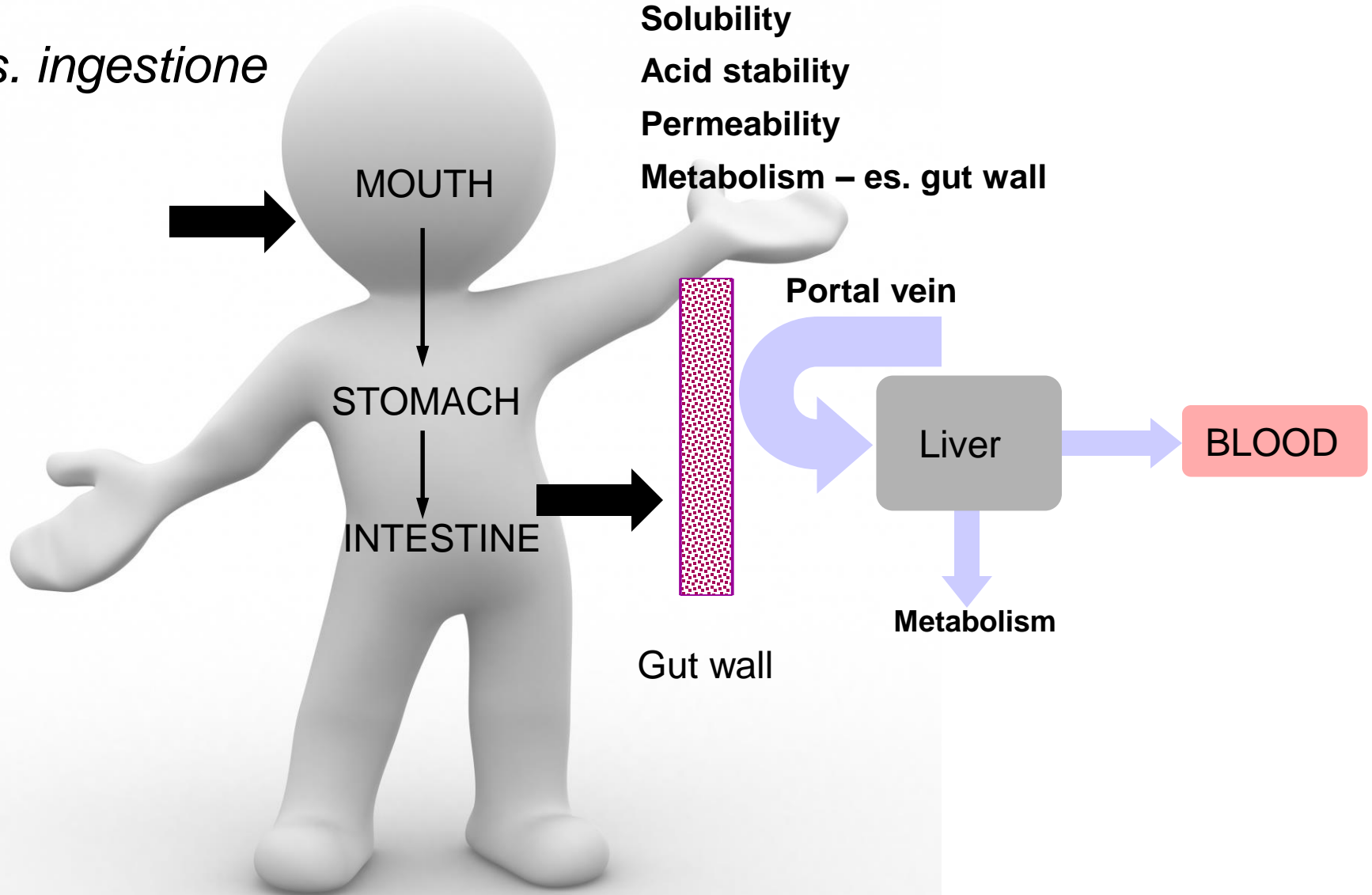
Factors affecting absorption:

Solubility

Acid stability

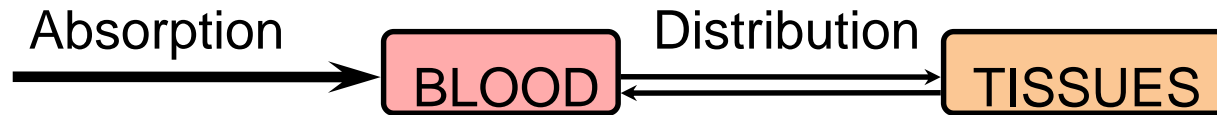
Permeability

Metabolism – es. gut wall



# Distribution

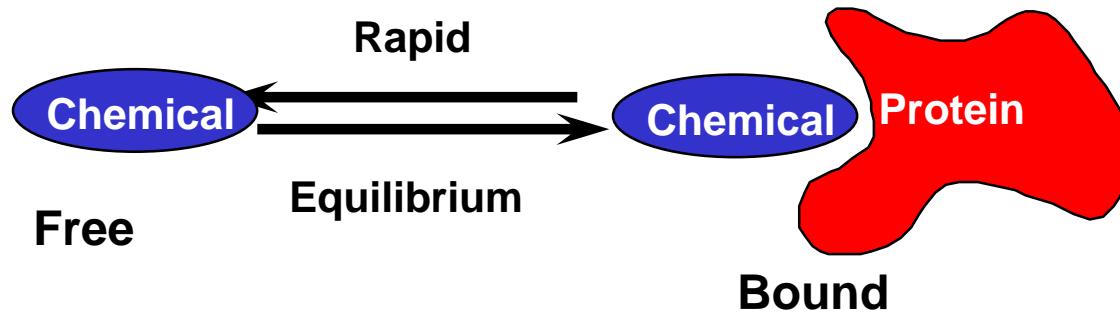
**Distribution:** the *reversible* transfer of a chemical to and from the systemic circulation



**Compounds can distribute out of plasma into tissues:**

**Main factors influencing distribution are pKa, lipophilicity, plasma protein binding (only unbound chemical is free to distribute in tissues ).**

# Plasma Protein Binding (PPB)



Chemicals can bind to macromolecules in the blood – known as plasma protein binding (PPB)

Only unbound compound is available for distribution into tissues

Acids bind to basic binding sites on *albumin*, bases bind to *alpha-1 acid glycoprotein*

0-50% bound	= negligible
50-90%	= moderate
90-99%	= high
>99%	= very high

For bases and neutrals, PPB is proportional to  $\log D$ .

Acidic drugs tend to have higher PPB than neutral/basic drugs.



**Definition:** Any chemical alteration of a drug/chemical by the living system

**Purpose:** To enhance water solubility and hence excretability

## Types of metabolism

- Phase I: production of a new chemical group on the molecule
- Phase II: addition of an endogenous ligand to the molecule

## Sites of metabolism

- Main site of metabolism is the liver.
- Other sites include the gastrointestinal wall (CYP-450), kidneys, blood etc.

## Factors affecting metabolism

- The structure of a drug influences its physicochemical properties. (blocking/altering sites of metabolism can improve DMPK properties)
- MW, LogP/LogD, pKa
- The more complex the structure, the more the potential sites for metabolism.

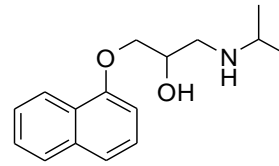
# Phase I Metabolism

## (i) Oxidation

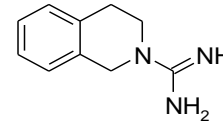
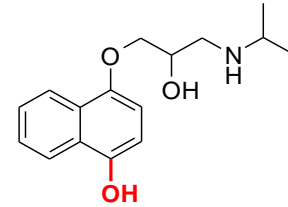
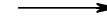
Aliphatic or aromatic hydroxylation

N-, or S-oxidation

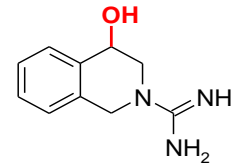
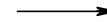
N-, O-, S-dealkylation



**Propranolol**  
( $\beta$ -blocker)



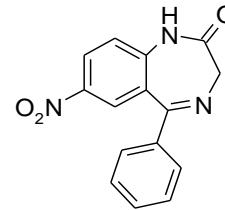
**Debrisoquine**  
(anti-hypertensive)



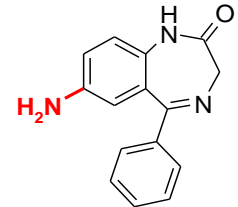
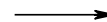
## (ii) Reduction

Nitro reduction to hydroxylamine/ amine

Carbonyl reduction to alcohol



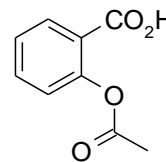
**Nitrazepam**  
(hypnotic)



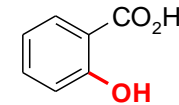
## (iii) Hydrolysis

Ester or amide to acid and alcohol or amine

Hydrazides to acid and substituted hydrazine



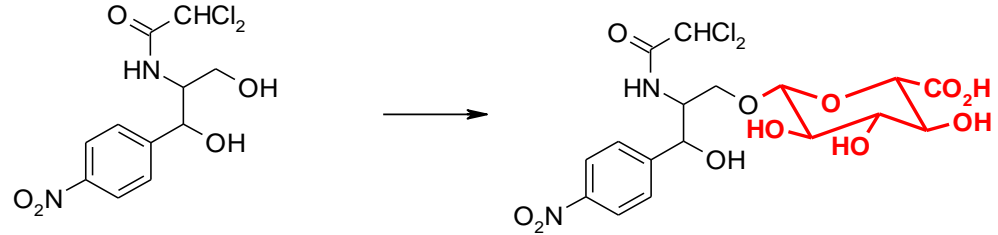
**Aspirin**  
(Analgesic)



# Phase II Metabolism

## (i) Glucuronidation

Carboxylic acid, alcohol, phenol, amine



**Chloramphenicol**  
(antibiotic)

## (ii) Amino acids

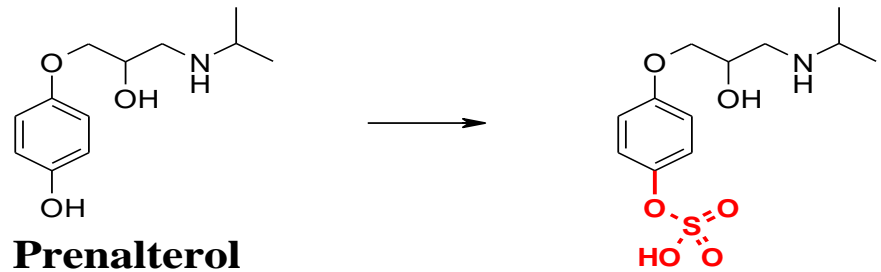
Carboxylic acids

## (iii) Acetylation

Amines

## (iv) Sulfation

Alcohol, phenol, amine

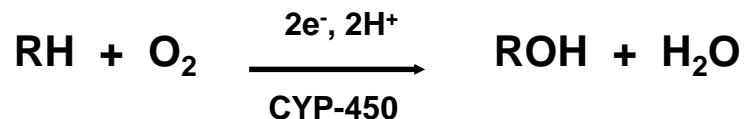


**Prenalterol**  
( $\beta$ -blocker)

## (v) Glutathione conjugation (gly-cys-glu)

Halo-cpds, epoxides, arene oxides, quinone-imine

# Cytochrome P450 Enzymes (CYP-450)



Many Phase I oxidations are mediated by cytochrome P450 enzymes.

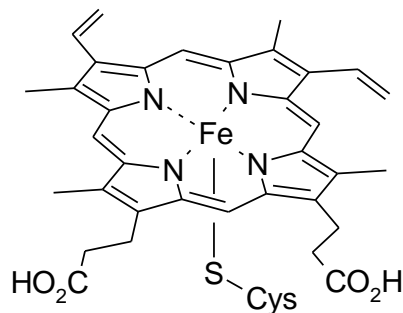
Membrane bound proteins - found on the endoplasmic reticulum.

Heme-containing proteins – porphyrin ring co-ordinating iron at the active site.

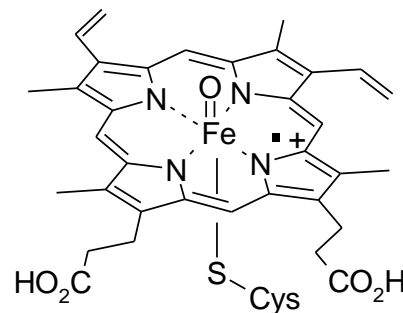
Many iso-forms with different substrate specificities:

**Major human CYP's: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4**

CYP inhibition/induction:



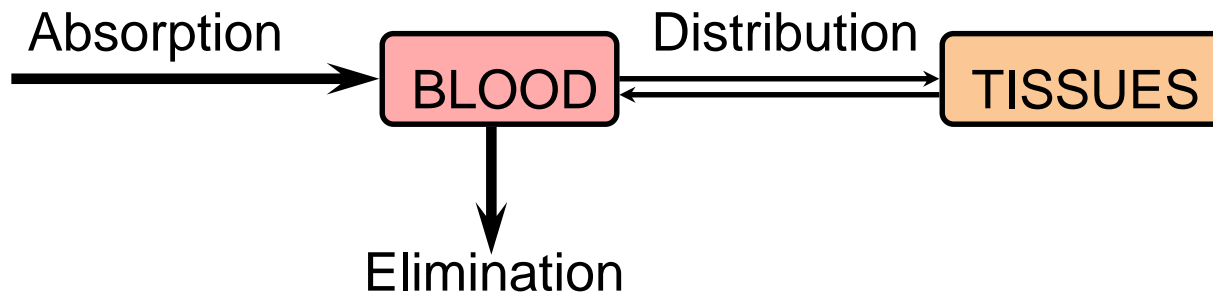
**Iron(III) porphyrin**



**Active oxygen Fe (IV) species**

*ADME*

## Excretion (Elimination)



**Elimination:** the *irreversible* transfer of a chemical from the systemic circulation

**Major routes of elimination:**

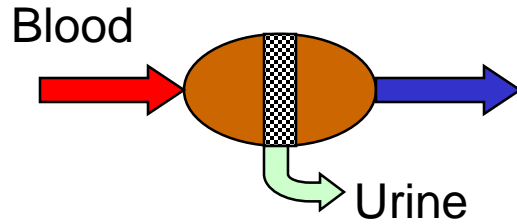
Metabolism

Renal excretion (for free chemical, ie low logD)

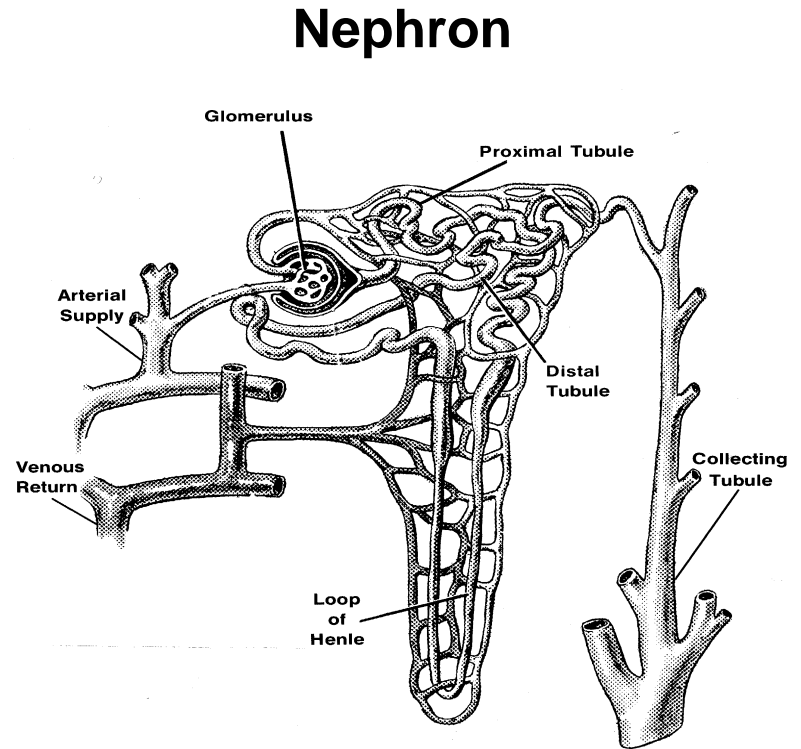
Biliary excretion

Also lungs, sweat etc.

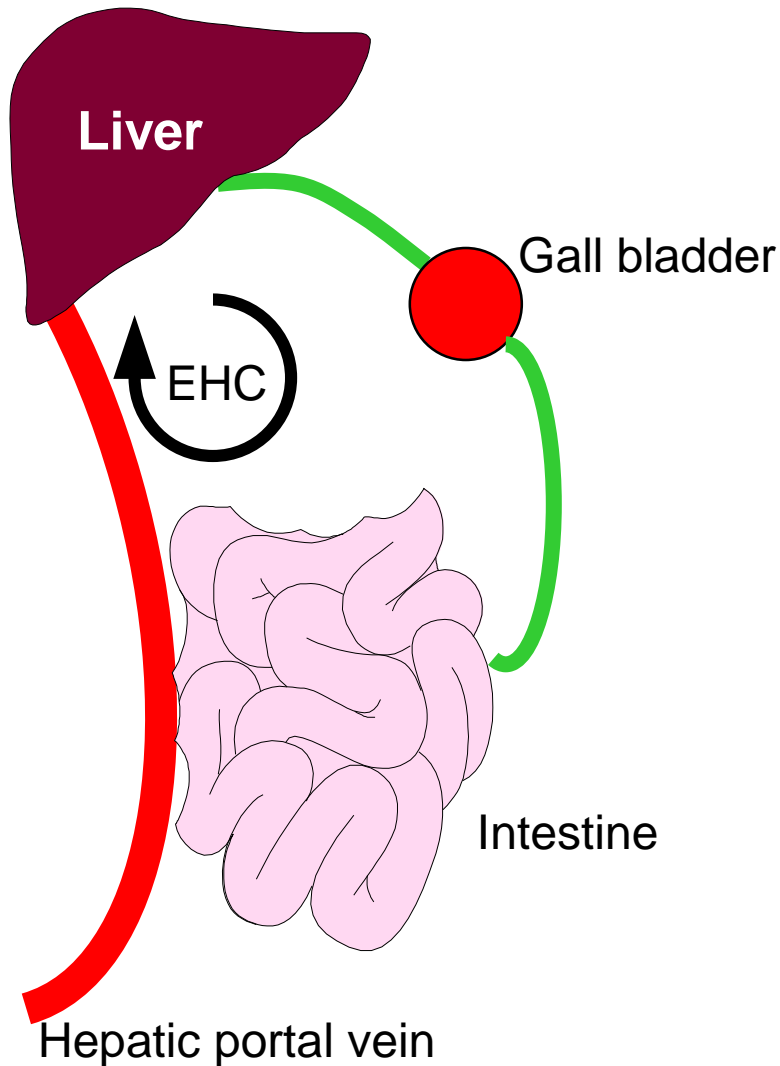
# Renal Excretion



1. All **unbound** chemical in plasma is filtered in the glomerulus. Only significant for very polar compounds,  $\log D < 0$ .
2. Some compounds are actively secreted into urine along the proximal tubule.
3. Unionised chemical can undergo passive reabsorption from urine into blood along the length of the nephron (net excretion may be zero).
4. Chemical that is bound to plasma proteins is not filtered.



# Biliary Excretion

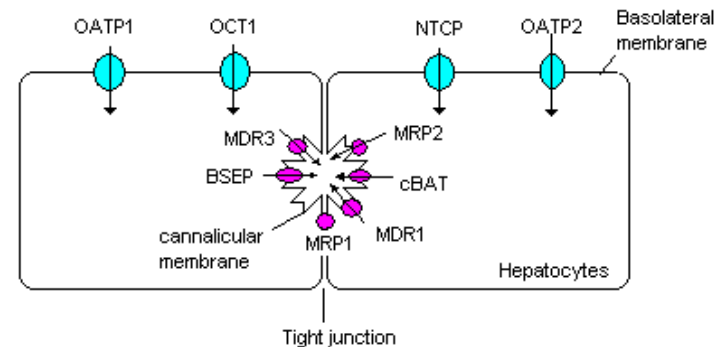


In the liver chemicals can be secreted into the bile

Transporters in the basolateral and canalicular membranes of hepatocytes mediate uptake into the hepatocyte and efflux into bile

Biliary clearance is commonly higher in Rats/Mice than in Dog/Man

Bile collects in gall bladder, then released into intestine upon food intake. Chemical may then be reabsorbed - known as enterohepatic recirculation (EHC).



# Tossicologia cinetica: Specie trasportate / metabolizzate

## Veleni sistemici, possono attraversar membrane e agire su recettori

Quando consideriamo la pericolosità di una **sostanza** assumiamo che gli effetti avvengano per **interazione tra essa ed un sito recettore**. Si ha una *risposta solo se un quantitativo sufficiente della specie o di un suo metabolita attivo raggiunge il recettore*. Ciò evidenzia la rilevanza dell'informazione sui processi di **assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)**, molto studiati in farmacologia, che determinano il destino all'interno del corpo e le dosi interne al sito bersaglio.

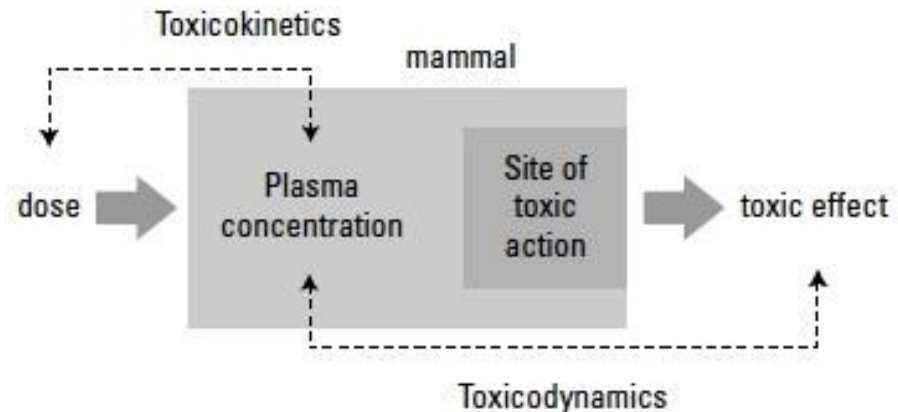


Figure 6.2. Toxicokinetics



**Biocinetica** - decorso temporale di una sostanza chimica in un organismo vivente, vale a dire, aumento o la diminuzione di sostanza presso il sito di misura dovuti a trasporto o trasformazione o degradazione. Il termine "tossicocinetica" è spesso usato come sinonimo

*RAoC Iled p.229*

*Deve rispondere a domande in termini di*

*Cosa e quanto?*

*Dove?*

*Quando (velocità/tasso)?*

*Es un composto ha un'emivita di 6h nel plasma (dove?)*

Toxicokinetic Modeling of Persistent Organic Pollutant Levels in Blood from Birth to 45 Months of Age in Longitudinal Birth Cohort Studies

<http://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/121/1/ehp.1205552.pdf>

**Le curve della concentrazione contro il tempo di una sostanza nel plasma o nel sangue sono risultati importanti per gli studi cinetici: sono surrogati per descrivere le concentrazioni al tessuto bersaglio. Si calcola la dose interna/ **esposizione interna** come **AUC - area sotto la curva** (concentrazione nel plasma vs tempo). Le AUC sono usate anche per valutazioni interspecie – diversità di assorbimento**

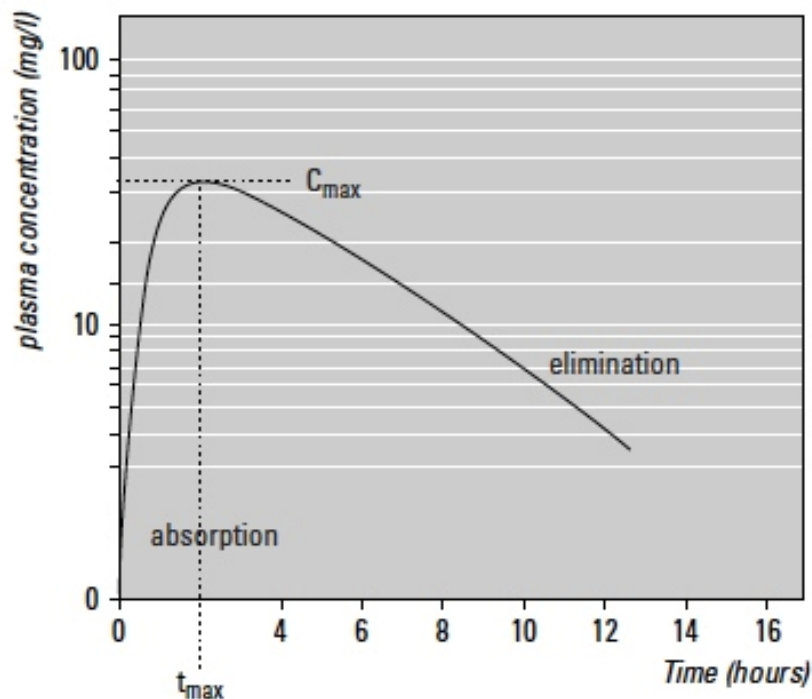


Figure 6.3. Absorption and elimination (<http://coo.lumc.nl/TRC/>).

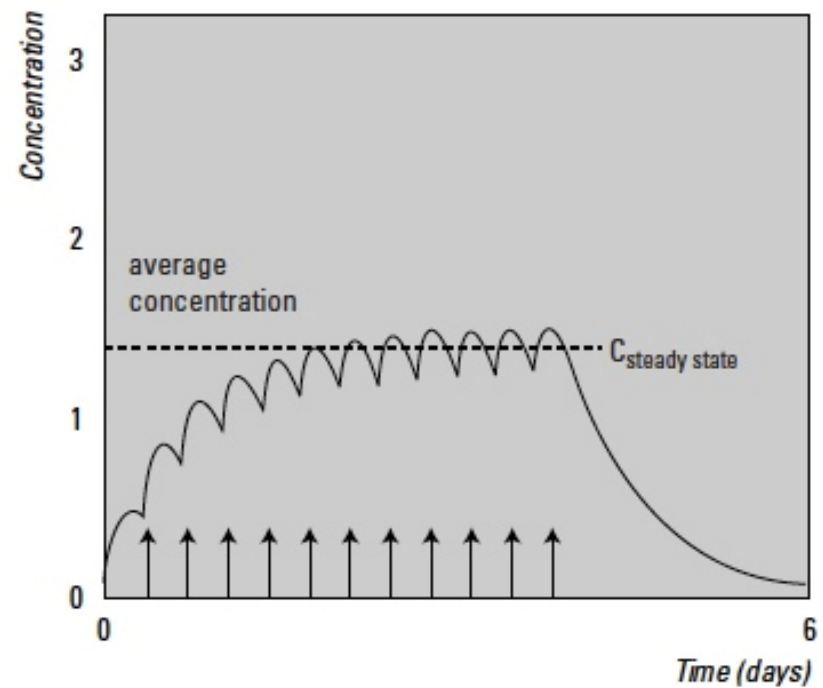
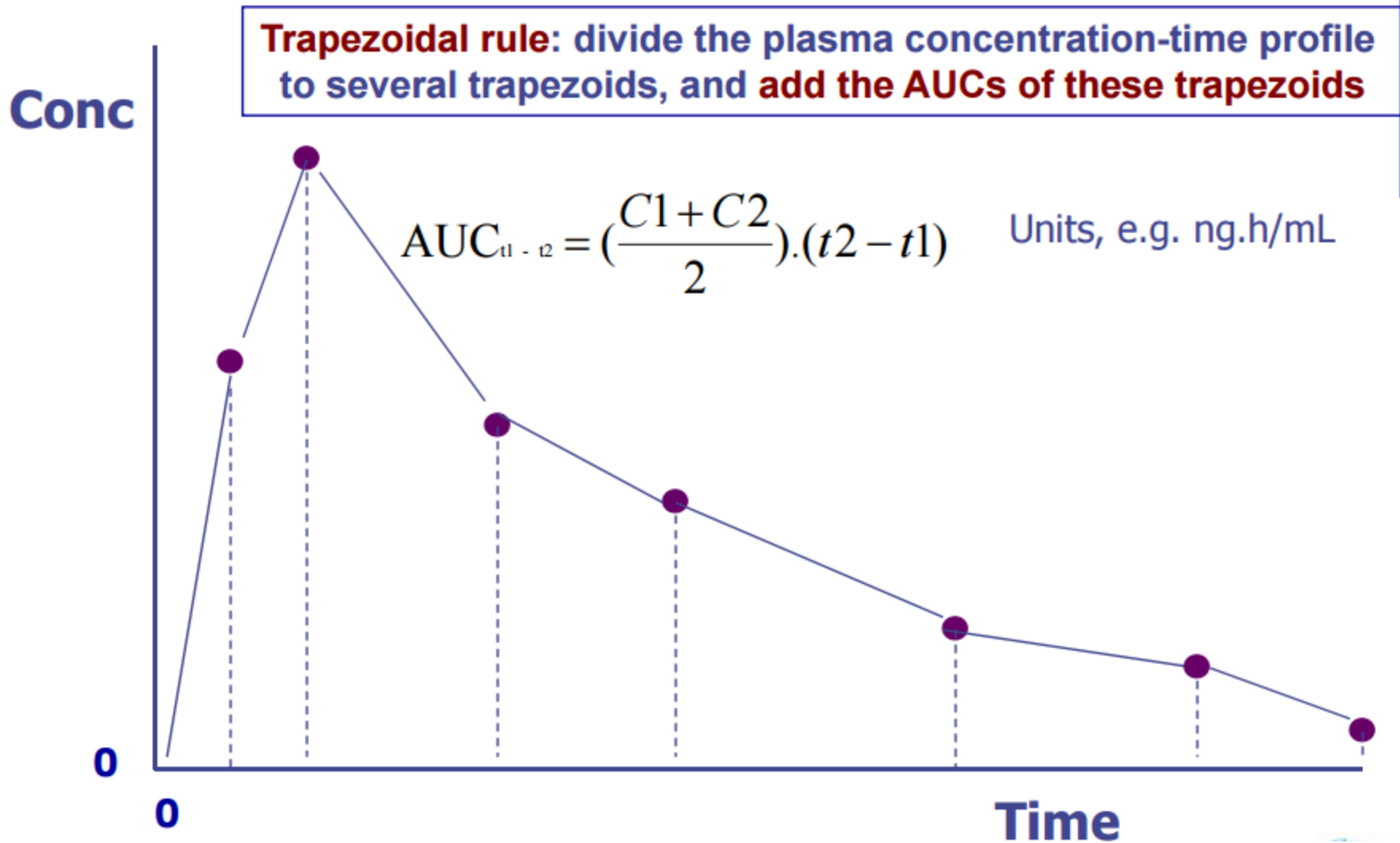


Figure 6.4. Steady-state (<http://coo.lumc.nl/TRC/>).



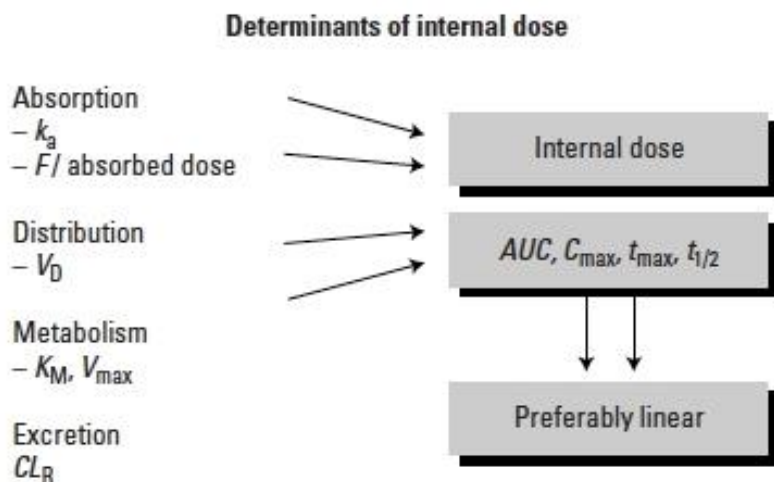
# Parametri rilevanti per definire le dosi interne

Table 6.2. Primary parameters of ADME.

Process	Primary parameter
Absorption	absorption rate constant ( $k_a$ ) and <u>bioavailability (<math>F</math>)<sup>1</sup></u>
Distribution	apparent volume of distribution ( $V_D = A / C$ ) <sup>2</sup> as an indicator of the tissues involved
Metabolism	intrinsic clearance, described by $V_{max}$ and $K_M$
Excretion	sum of biliary excretory and renal clearance ( $CL$ ), irreversible loss of compound from the body

<sup>1</sup>  $F$  = Fraction of dose reaching the systemic circulation. It should be noted that bioavailability has a different meaning in environmental toxicity issues, where the bioavailable fraction is the fraction of the total amount of a chemical present in a specific environmental compartment that, within a given time span, is either available or can be made available for uptake by organisms, micro-organisms or plants. Substances that are irreversibly bound to, e.g. soil or sediment, are not bioavailable.

<sup>2</sup>  $A$  = amount in body at equilibrium,  $C$  = concentration in blood.



Intrinsic Clearance ( $CL_{int}$ ),  
 Maximum Velocity of the Metabolic Reaction ( $V_{max}$ ),  
 Michaelis Constant ( $K_M$ )

Figure 6.5. Determinants of internal dose (for symbols see Table 6.2).

Ripartizione a partire dal sangue (**blood partitioning**) è definita in base al tessuto target; le costanti di partizione dipendono da proprietà chimico fisiche della sostanza e proprietà chimico fisiche del tessuto (es. contenuto lipidico e proteico)

Velocità e entità/estensione della partizione:

Velocità: **velocità di perfusione** (la velocità del flusso di sangue attraverso i capillari per unità di massa di tessuto, espressa in millilitri al minuto per 100 g)

Estensione: Il **volume di distribuzione** ( $V_d$ ) indica la capacità di diffusione e penetrazione di farmaci o tossici nei vari organi e tessuti. Si definisce come il volume teorico che sarebbe necessario a contenere la quantità totale di farmaco/chemical presente nell'organismo alla stessa concentrazione di quella presente nel plasma. Si calcola come rapporto tra la dose di farmaco presente nell'organismo (che nel caso di un assorbimento del 100% corrisponde alla dose somministrata) e la concentrazione plasmatica del farmaco stesso.

Nell'organismo vengono distinti tre compartimenti di fluidi:

plasma (circa 3 litri) / fluidi interstiziali / fluidi intracellulari.

Il plasma e i fluidi interstiziali formano insieme i fluidi extracellulari, pari a circa 12-13 litri.

La somma di questi tre volumi costituisce l'acqua totale corporea o TBW (Total Body Water), che consiste per definizione nel volume di distribuzione dell'acqua triziata, e che è pari cioè a circa 42-43 litri in un soggetto di peso normale (circa 70 kg).

A seconda della sua idro- o liposolubilità, una sostanza può avere volumi di distribuzione molto diversi.

Sostanza	Vd	Compartimento corporeo	Comportamento
Molto polare (es. <a href="#">Blue Evans</a> )	3,3 litri	<b>Plasma</b>	Non passa le membrane delle cellule endoteliali e non esce dal plasma
Idrosolubile (es. <a href="#">mannitolo</a> )	12 litri	<b>Acqua extracellulare</b>	Passa nell'interstizio ma non entra nelle cellule
Liposolubile (es. <a href="#">cloramfenicolo</a> )	42 litri	<b>Acqua totale</b>	Passa senza problemi tutte le membrane cellulari
Molto liposolubile (es. <a href="#">metoprololo</a> )	330 litri	Vd apparente	Lega le proteine plasmatiche e si deposita nel tessuto adiposo

*Biodisponibilità F: paragone tra AUC per la via di esposizione d'interesse (es. orale) e per la somministrazione intravenosa (riferimento)*

$$F = D_{i.v.} / D_x * AUC_x / AUC_{i.v.}$$

*X è la via di esposizione considerata*

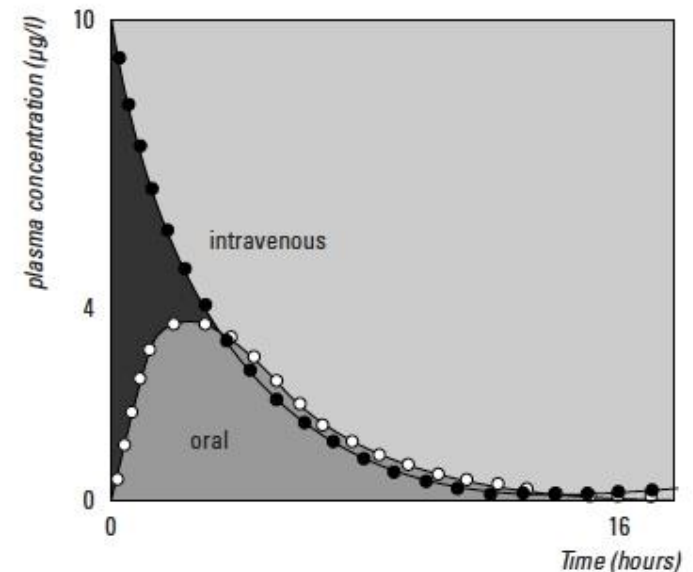
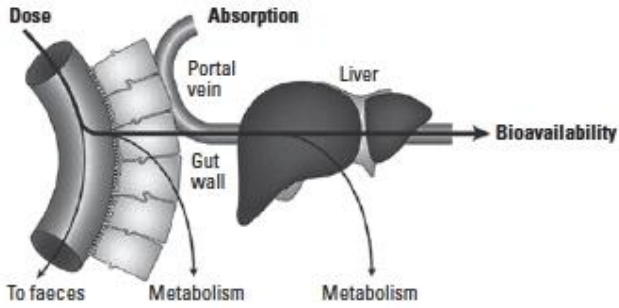


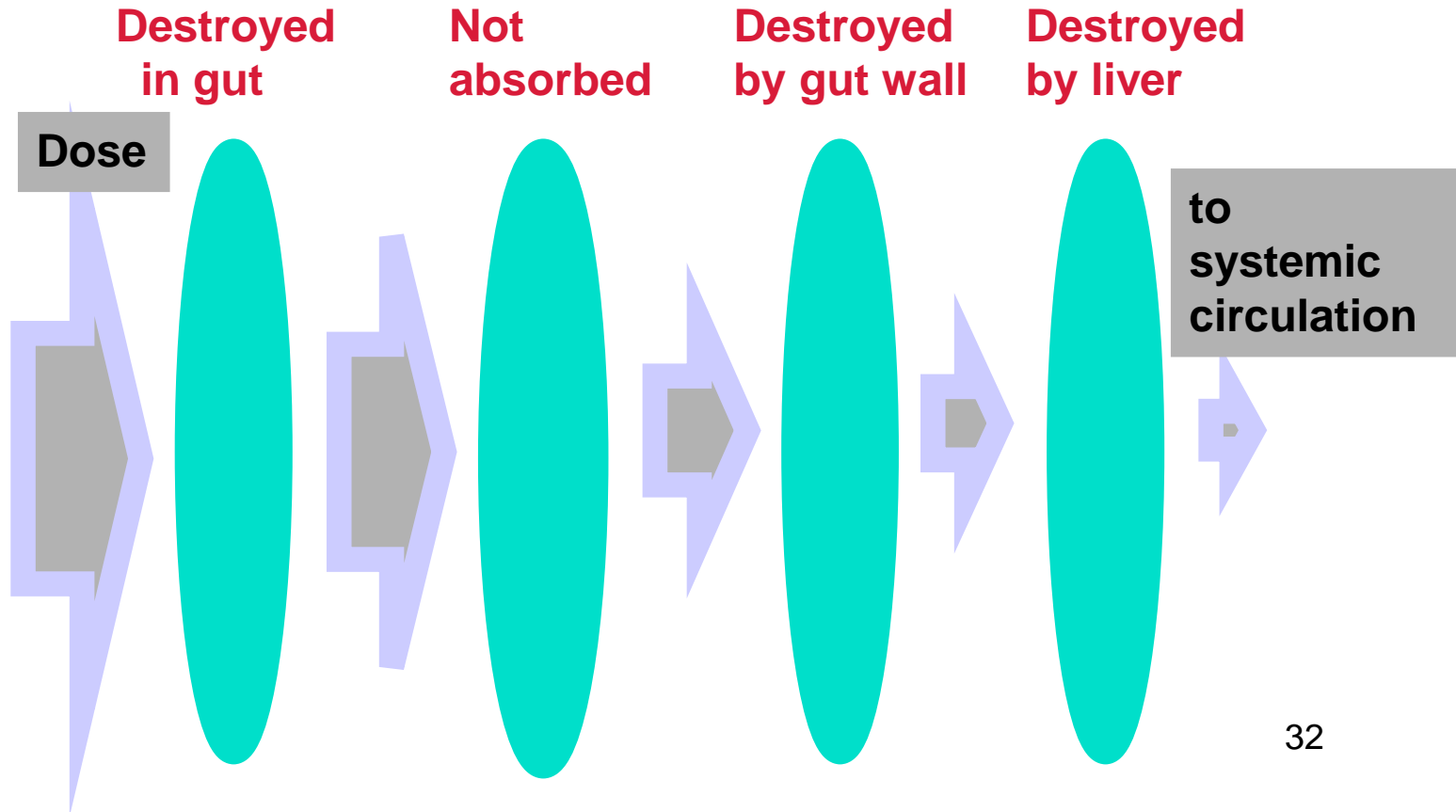
Figure 6.7. AUC oral (○○○) versus AUC intravenus (●●●).  
Source: <http://coo.lumc.nl/TRC/>.

**Assorbimento = passaggio di membrana** (epitelio polmonare, epidermide, tratto gastrointestinale), **che può essere seguito da biotrasformazione** (può diminuire la biodisponibilità!!!)



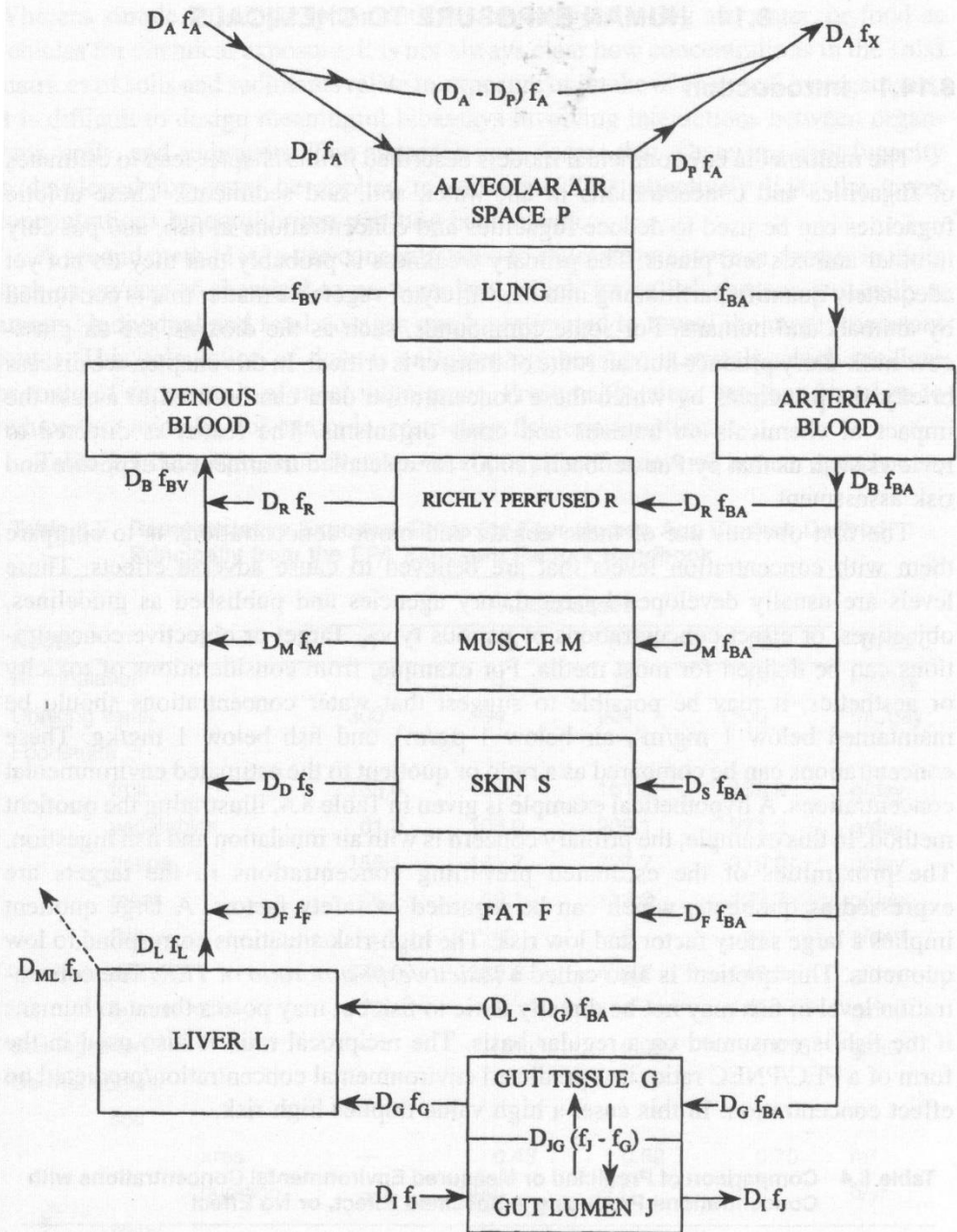
# Bioavailability

Figure 6.6. Bioavailability [22]. With permission.





# Modelli PBPK



[http://users.ugent.be/~lvbortel/Friday\\_1.pdf](http://users.ugent.be/~lvbortel/Friday_1.pdf)

Figure 8.12 Transport and transformation in a multicompartment pharmacokinetic model as applied to humans.

**Attenzione alle estrapolazioni** da una via d'esposizione ad un'altra...

Es. da ingestione a inalazione o contatto dermico in igiene occupazionale.

Se “costretti” si aumentano i margini di sicurezza.

- Distribuzione ed accumulo

*Interspecies extrapolation – Differences in the lipid and protein content of tissues may result in species dependent distribution. Further, species specific excretion capacity may result in increased  $V_D$  and increased tissue concentrations (e.g., saturation of renal excretion in dog for phenoxyacetic acid compound).*

*Intraspecies extrapolation – Females often have increased fat content compared to males, possibly resulting in a different  $V_D$ .*

- Metabolismo ed estrapolazioni tra vie di esposizione

*Interspecies extrapolation – Activating or deactivating metabolism may be very species-specific.*

*Intraspecies extrapolation – Biotransformation in neonates and very young animals and children is qualitatively and quantitatively different from adults and young adults; variation due to age, pregnancy, lifestyle.*

*Route-to-route extrapolation (different first-pass effects) – Activation or deactivation by first-pass metabolism may be route-specific, thereby making route-specific metabolism the Achilles' heel of route-to-route extrapolation.*