

# **Valutazione del rischio chimico**

CdL Magistrale Interateneo in  
Analisi e Gestione Ambientale  
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)***

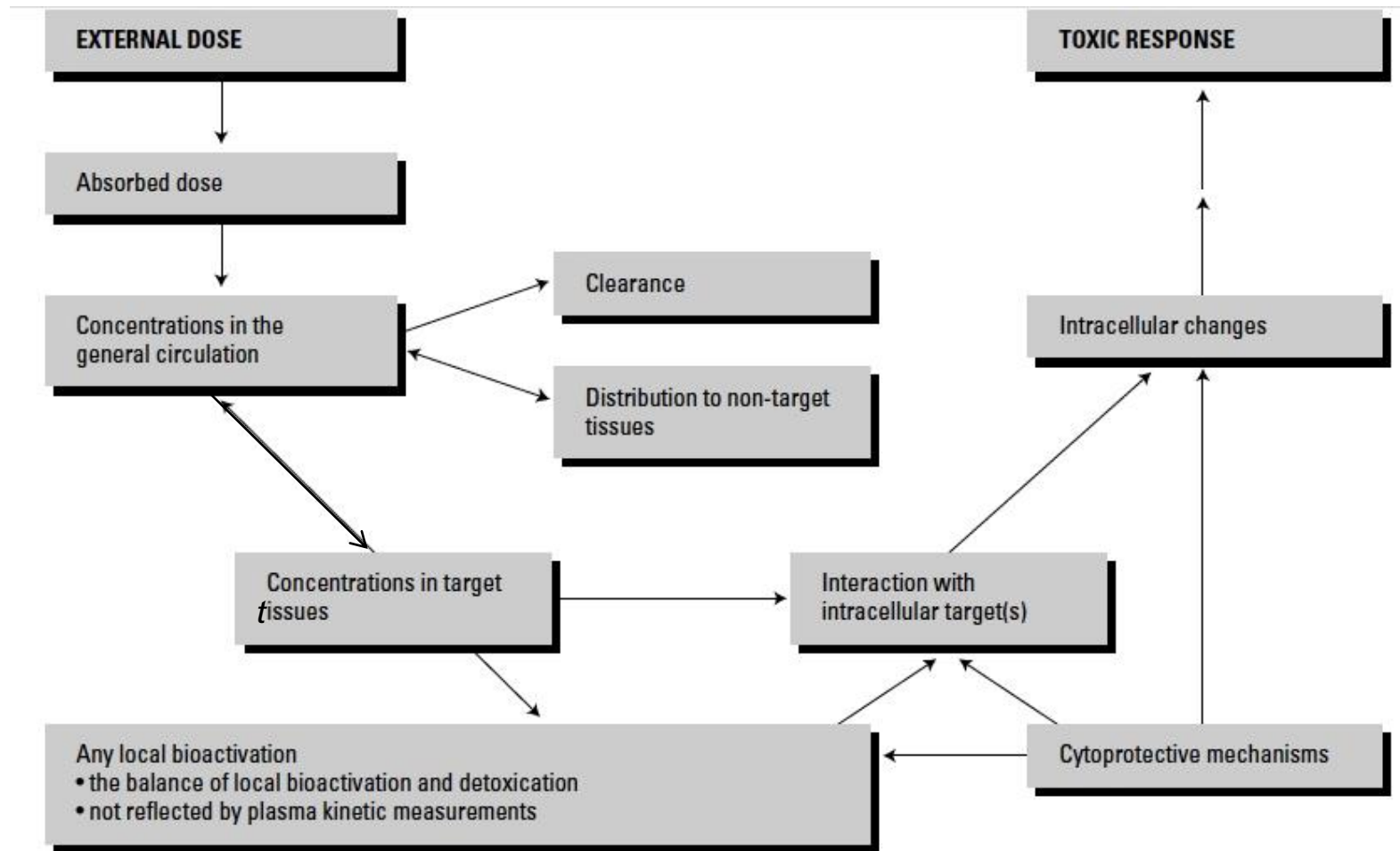


Figure 6.1. Processes leading to the generation of a toxic response [2].

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 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.

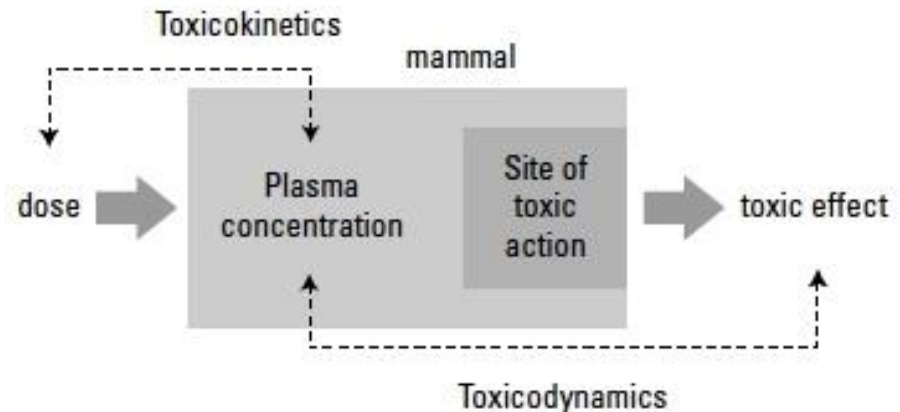


Figure 6.2. Toxicokinetics

**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

<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/pdf/10.1289/ehp.1205552>

***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 per varie estrapolazioni (es interspecie)***

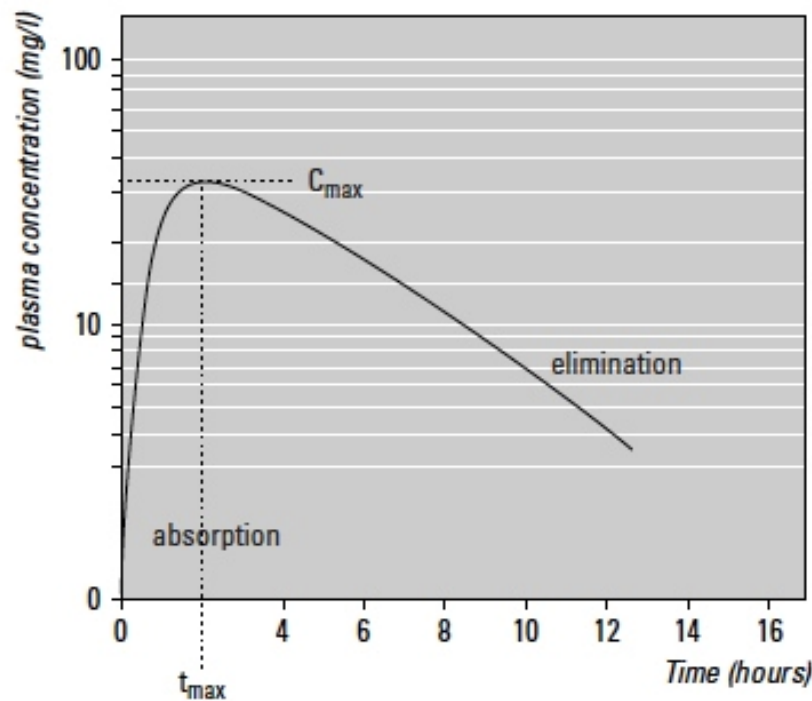


Figure 6.3. Absorption and elimination (<http://coo.lumc.nl/TRC/>).

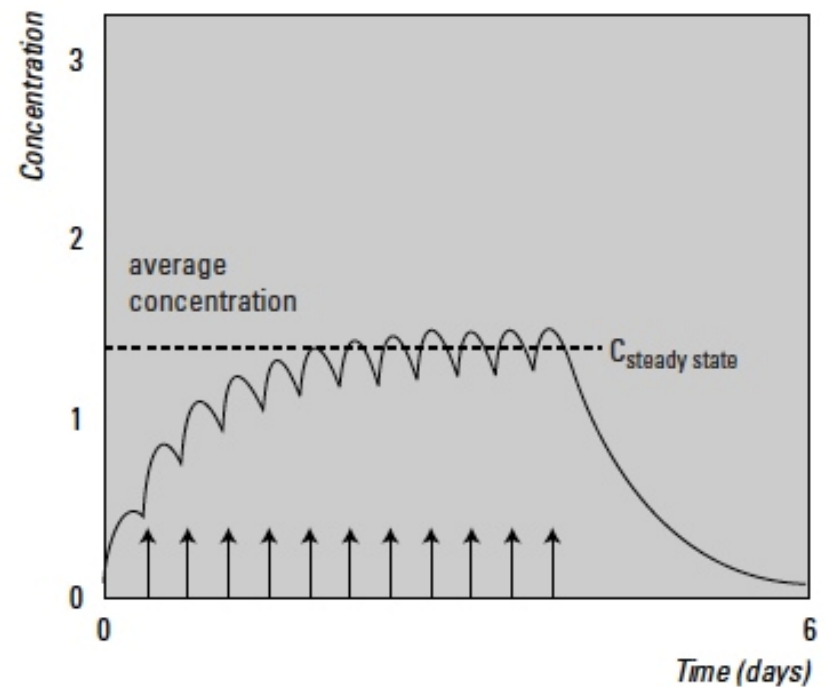
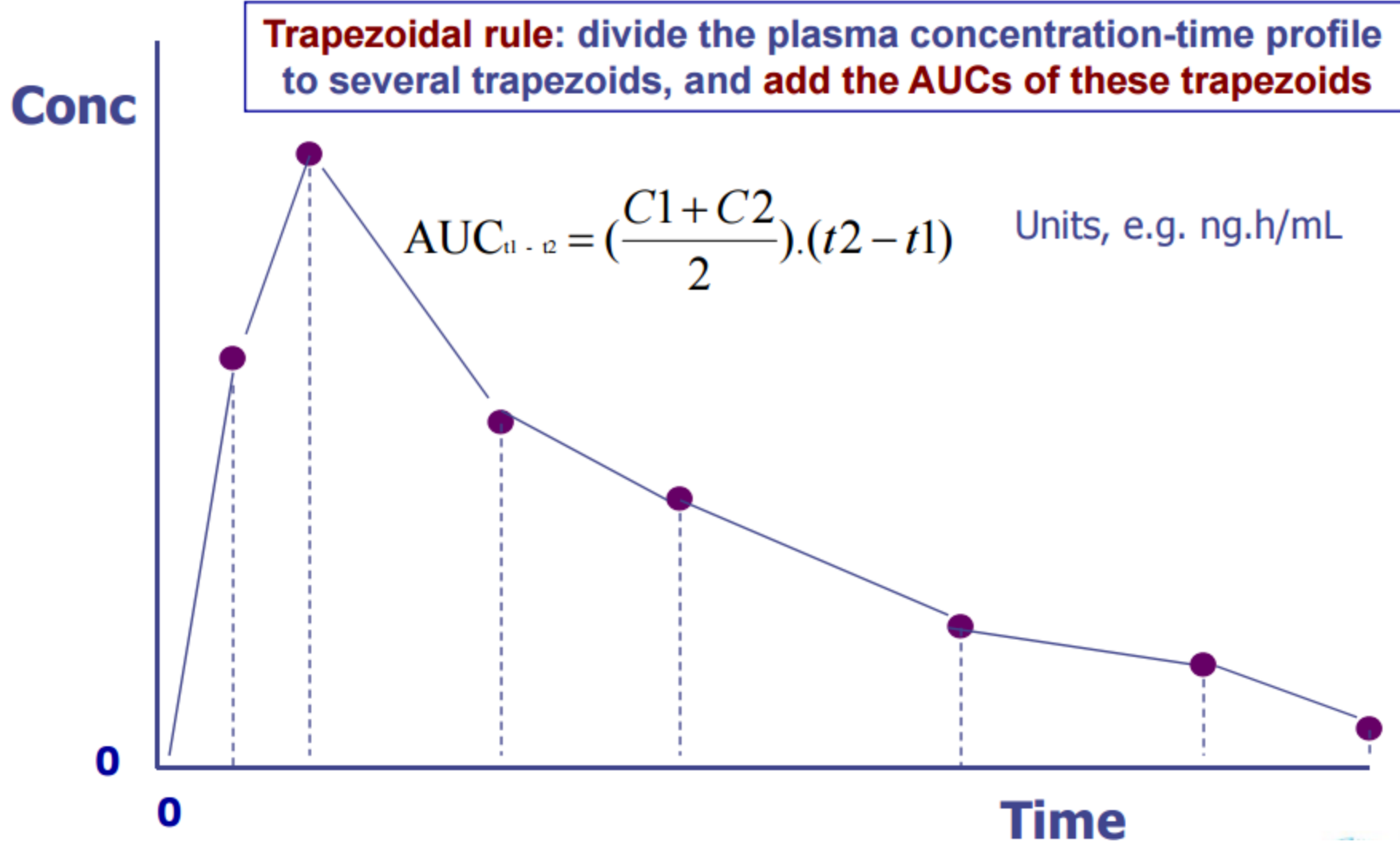


Figure 6.4. Steady-state (<http://coo.lumc.nl/TRC/>).



# 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>)</u> <sup>1</sup>
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.

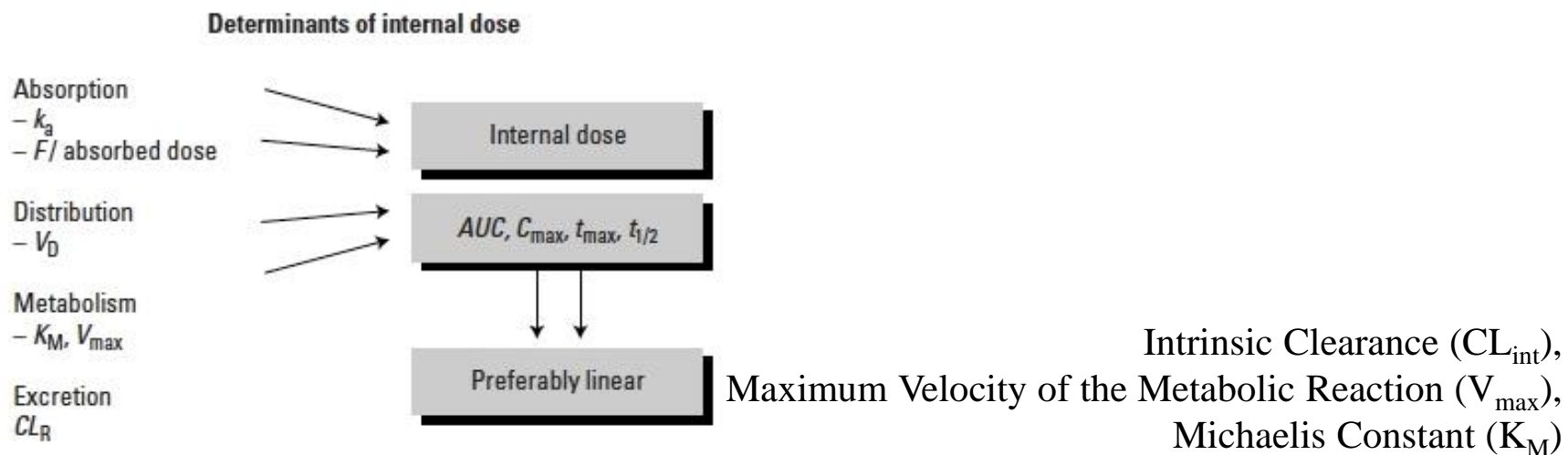


Figure 6.5. Determinants of internal dose (for symbols see Table 6.2).



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><i>Plasma</i></b>	Non passa le membrane delle cellule endoteliali e non esce dal plasma
Idrosolubile (es. <a href="#">mannitolo</a> )	12 litri	<b><i>Acqua extracellulare</i></b>	Passa nell'interstizio ma non entra nelle cellule
Liposolubile (es. <a href="#">cloramfenicolo</a> )	42 litri	<b><i>Acqua totale</i></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*

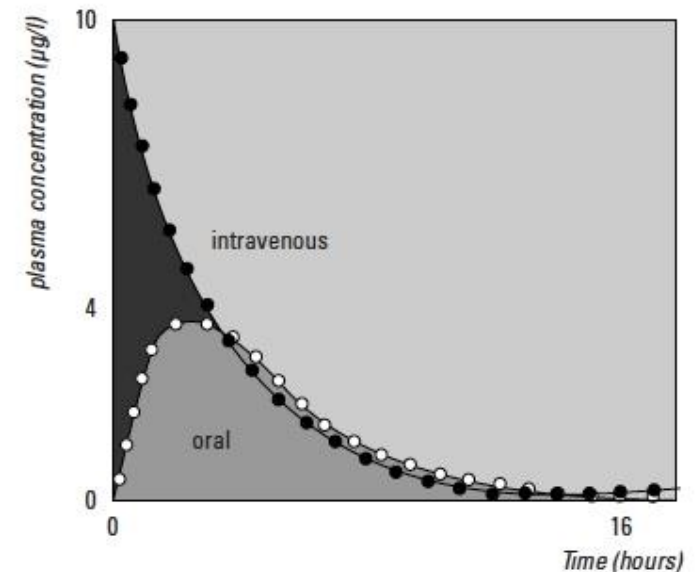
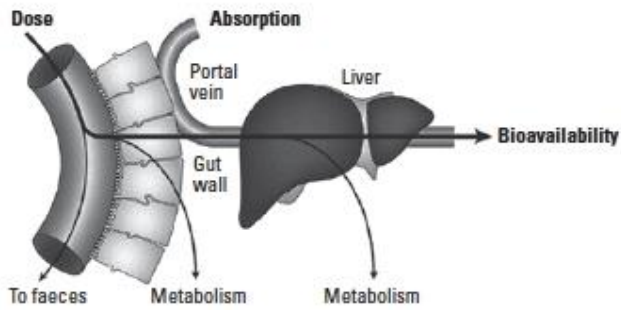


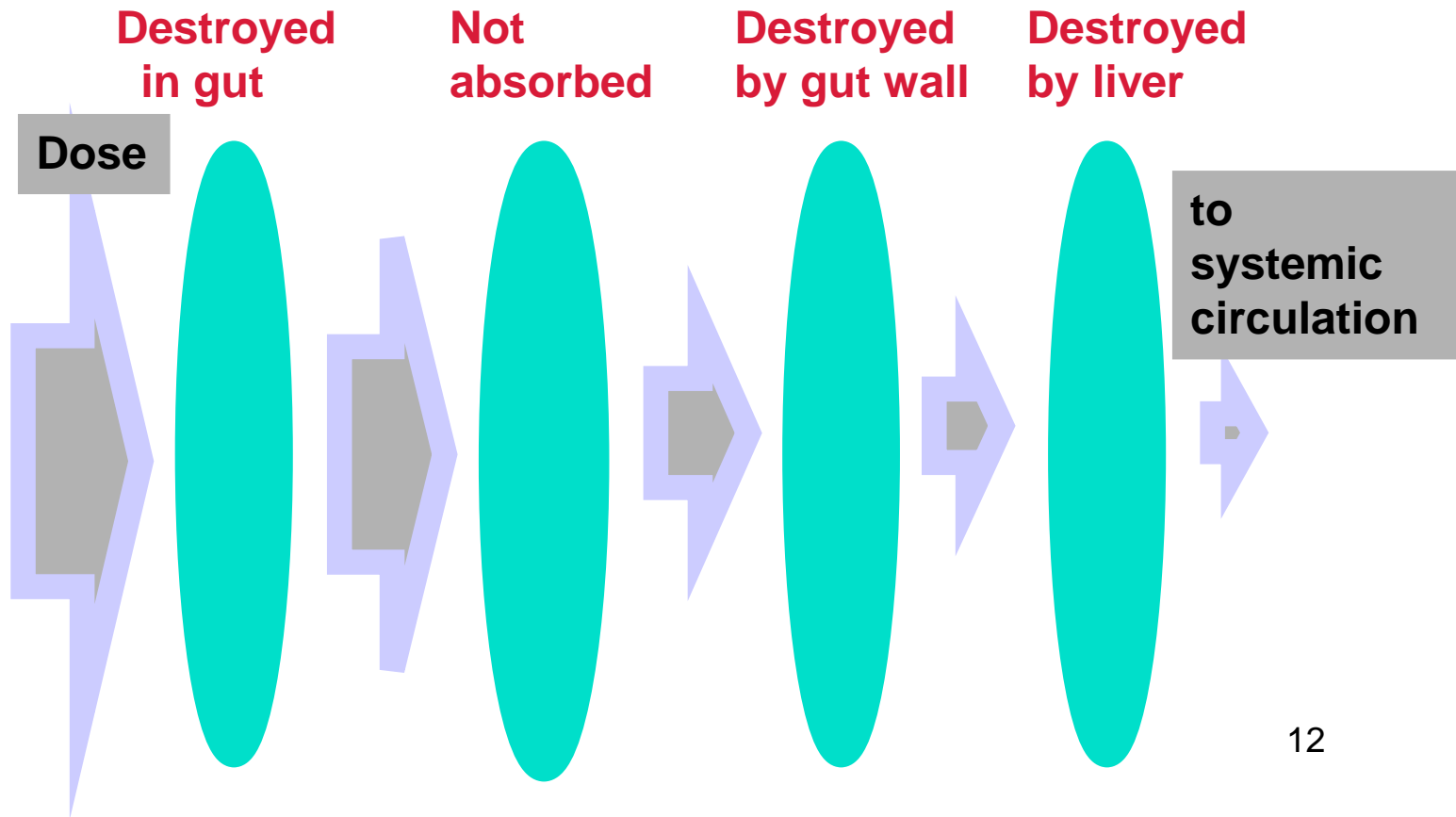
Figure 6.7. AUC oral (○ ○ ○) versus AUC intravenous (● ● ●).  
Source: <http://coo.lumc.nl/TRC/>.

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

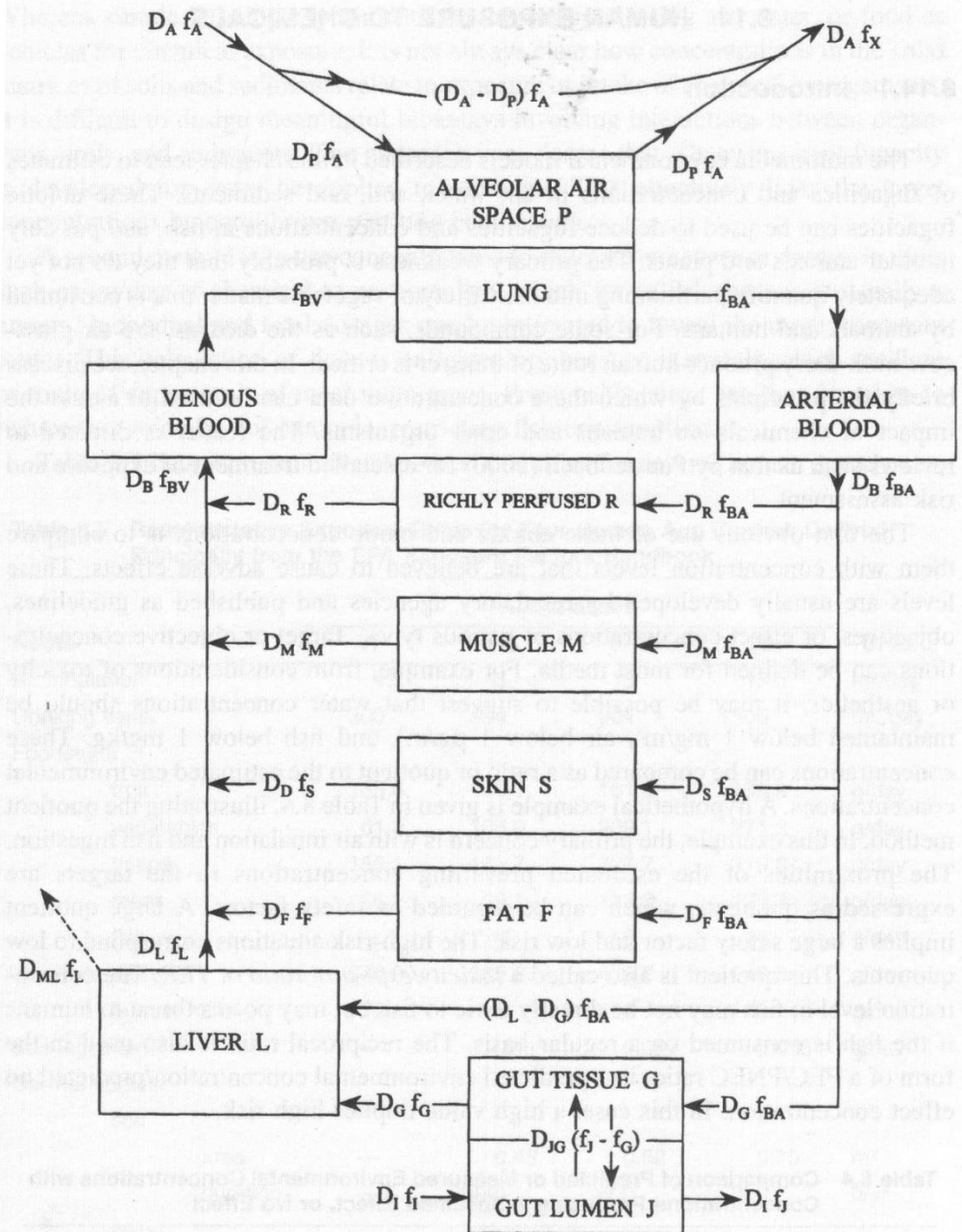


# Bioavailability

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

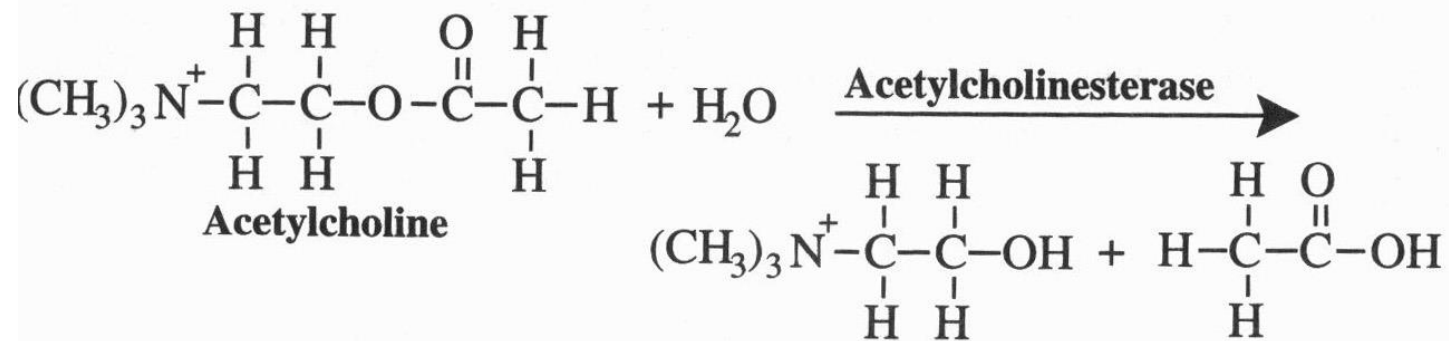
*Interspecies extrapolation – Activating or deactivating metabolism may be very species-specific.*

*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.*

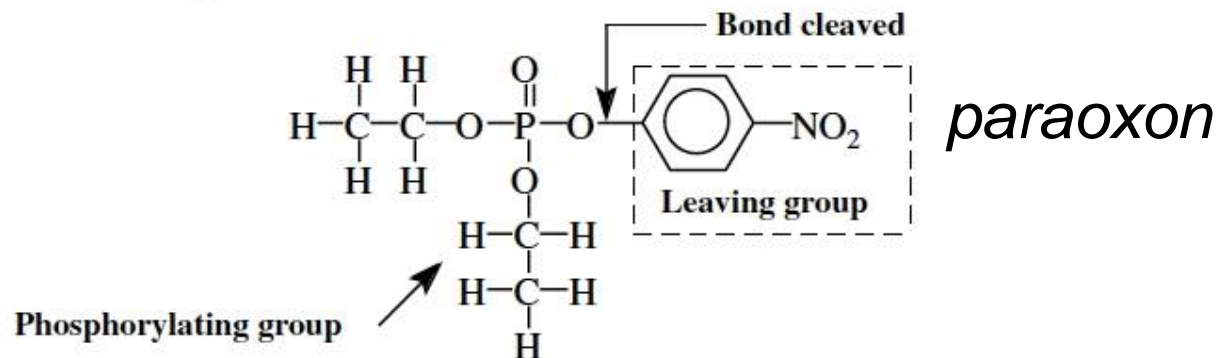
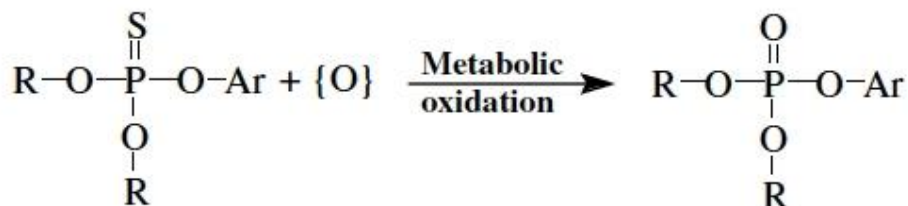
## RECETTORI e sostanze tossiche

Es. Funzionamento normale: l'acetilcolina è un neurotrasmettitore che deve essere idrolizzato enzimaticamente per evitare eccessiva stimolazione da parte ai recettori nervosi

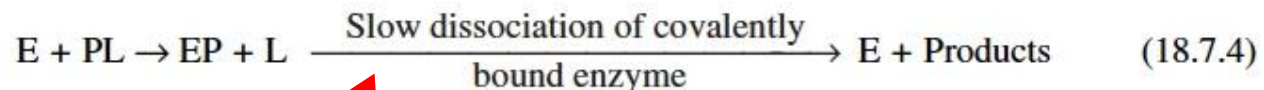




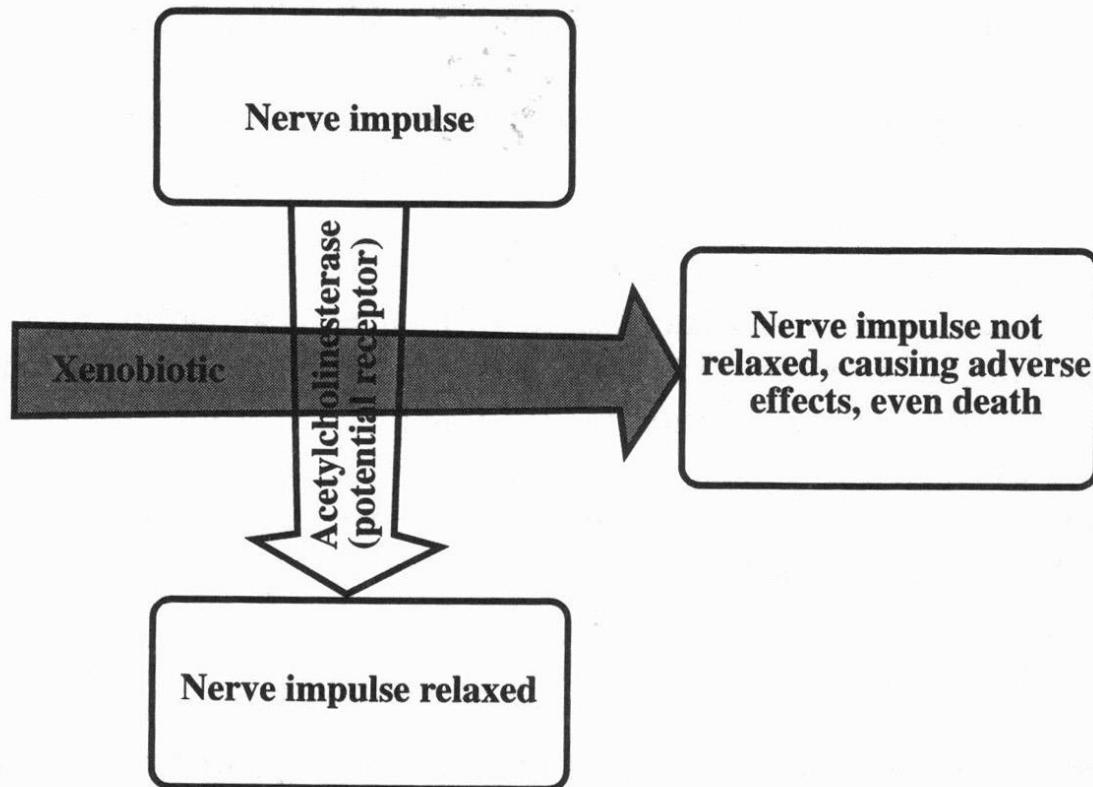
# Parathion -> Paraoxon attivazione



The reaction of this compound with cholinesterase enzyme (E) can be represented by the following reaction:



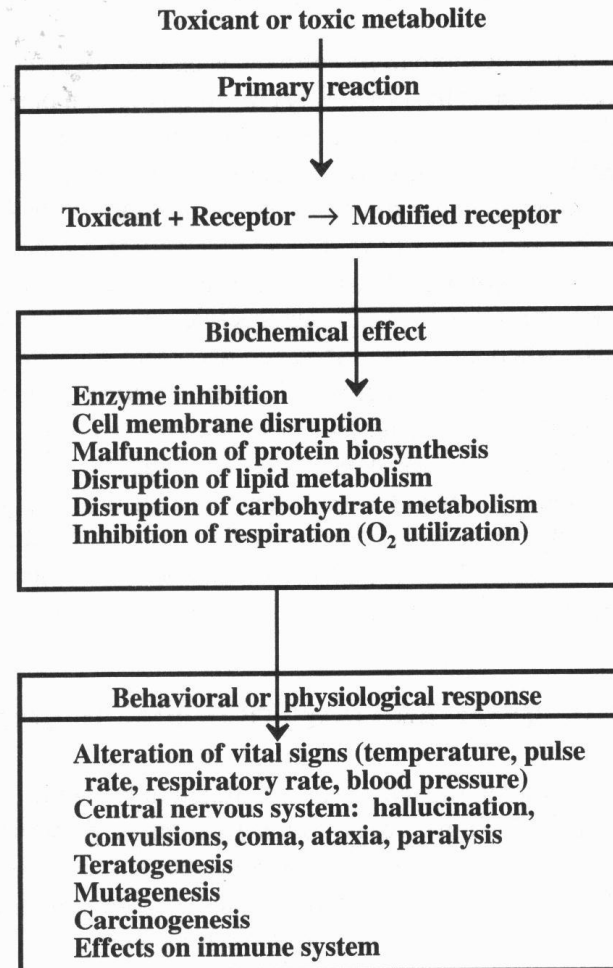
# Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



Example of a toxicant acting on a receptor to cause an adverse effect. When acetylcholinesterase is bound by a xenobiotic substance, the enzyme does not act to stop nerve impulse. This can result in paralysis of the respiratory system and death.

# Tossicologia – fasi di tossicità

Dopo la *fase cinetica*, che trasporta la specie tossica al recettore, inizia la ***fase dinamica***



Different major steps in the overall process leading to a toxic response.

# **Tossicologia – tossificazione e detossificazione**

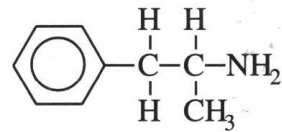
Composto genitore attivo

Metabolita attivo.

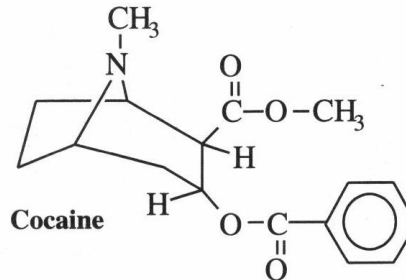
Effetti additivi / sinergici / di potenziamento /

Effetti antagonisti / “blockers” (competizione per un sito)

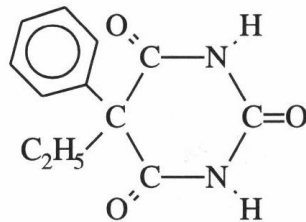
# Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



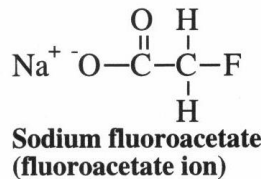
**Amphetamine  
(benzedrine)**



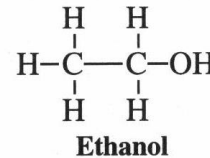
**Cocaine**



**Phenobarbital  
(a barbiturate)**

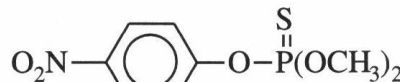


**Sodium fluoroacetate  
(fluoroacetate ion)**

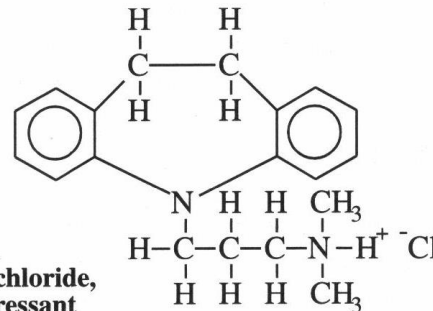


**Ethanol**

Examples of toxicants that affect body temperature. Amphetamine, cocaine, and fluoroacetate increase body temperature; phenobarbital and ethanol decrease it.



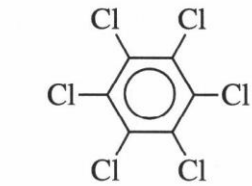
**Methyl parathion**



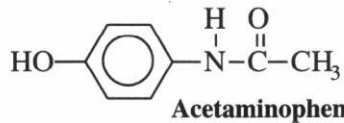
**Imiprimine hydrochloride,  
a tricyclic antidepressant**

Structures of toxicants that can affect pulse rate. Methyl parathion, a commonly used plant insecticide, can cause bradycardia. Imiprimine hydrochloride, a tricyclic antidepressant, can cause either tachycardia or arrhythmia.

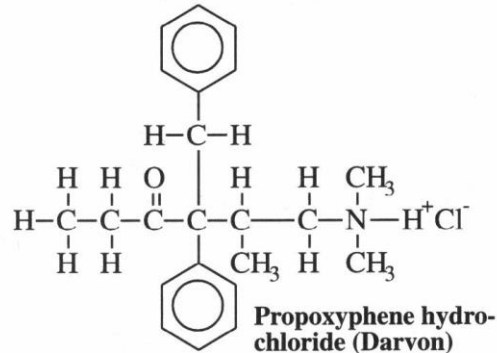
# Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



Hexachlorobenzene

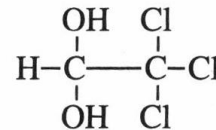


Acetaminophen

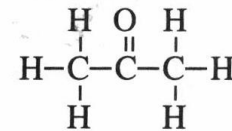


Propoxyphene hydrochloride (Darvon)

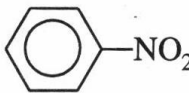
Some compounds that affect respiratory rate. Acetaminophen is one of the simple analgesics, which in therapeutic doses relieves pain without any effect on an individual's consciousness. Propoxyphene hydrochloride is a narcotic analgesic, a class of substances that can cause biochemical changes in the body leading to chemical dependency.



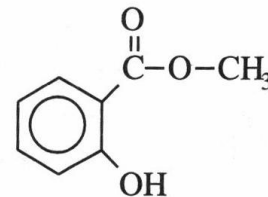
Chloral hydrate  
(pear odor)



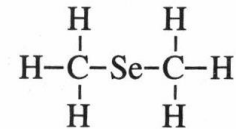
Acetone  
(acetone odor)



Nitrobenzene  
(shoe polish)



Methyl salicylate  
(wintergreen)



Dimethyl selenide  
(garlic)

# **Tossicologia – effetti riproduttivi e sullo sviluppo**

Effetti tossici sullo sviluppo

Effetti teratogeni (talidomide) (primo trimestre di gravidanza)

Effetti sul sistema riproduttivo

Effetti mutageni (alterazione del DNA)

## Studi sulla tossicità

Molti aspetti critici ci si riferisce spesso alla “**bibbia**” **gialla del WHO/OMS** “*Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals: Part I*”;

Indicazioni sono reperibili anche su “*Guidelines for testing chemicals*” dell’OECD/OCSE

Bada a:

- Proprietà chimiche

- vie d’esposizione

- Selezione e cura degli animali (dieta e condizioni di stabulazione)

- Acquisizione dei dati e presentazione e interpretazione dei risultati

- Good laboratory practices (US-FDA, USEPA, OECD, EC)*

Incertezze nei test su animali *UN International Program on Chemical Safety* (1978)



## **Aspetti generali**

**Test substance**

**Dose selection**

**Animal species**

**Test duration**

**Diet**

**Other environmental variables**

**Parameters studied**

**Electronic data processing**

**Presentation of results**

**Interpretation and evaluation of results**

**GLP**

**Requisiti del personale**

**Benessere degli animali**

**Dati umani**

**Incertezza e variabilità**

International Program on Chemical Safety. 1978.  
Principles and methods for evaluating the toxicity  
of chemicals. Part I. World Health Organization,  
*Environmental Health Criteria* 6.

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc006.htm>

## **Test di tossicità acuta:**

*singola dose o dosi ripetute nelle 24 ore*

*Esiti rilevati entro 14 giorni dall'esposizione*

*Richiesto nel REACh (esposizione orale se non sono disponibili dati di e. inalatoria) per sostanze con produzione importazione maggiore di 1*

*tonnellata/anno; per più di 10 t/y serve test su ulteriore via d'esposizione.*

*Si verifica in genere letalità*

## **Test acuti locali**

*Irritazione e corrosione* *richiesti nel REACh per sostanze con t/y >10*

*"Irritant substances are non-corrosive substances which cause inflammation as evidenced by erythema and oedema of the skin and corneal opacity, iridal effects and conjunctival redness or swelling for the eye. Corrosive substances may destroy living tissues."*

*In vivo su conigli / no dose-risposta, no LOEL*

*Sensibilizzazione* *richiesto nel REACh per sostanze con t/y >1*

Skin sensitization (-> allergic contact dermatitis) is a common form of allergy. Following skin exposure, it develops in 2 phases: induction (sensitization) and elicitation. 1) a primary immune response is triggered following a reaction between the chemical allergen and skin protein. 2) if the sensitized individual comes in contact with the same chemical allergen again in a later stage, a more pronounced secondary response<sup>26</sup> is induced

# Test di tossicità acuta

Table 5.2. Acute toxicity tests

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat, (mouse), rabbit, guinea pig, (dog)
Number of animals	5 of each sex per group
Dose levels	control and at least 3 or more if necessary for calculating LD50 or LC50 <sup>a</sup>
Examinations	<ul style="list-style-type: none"><li>- clinical examination for signs of toxicity or death</li><li>- gross examination</li><li>- histopathological examination if indicated</li></ul>
Results	the LD50 or LC50 value for each sex at 95% confidence interval

<sup>a</sup> If a dose of 2000 mg/kg<sub>bw</sub> does not cause acute toxicity and compound-related mortality, a full study may not be necessary.

Table 5.4. Evaluation and interpretation of results of acute toxicity tests (fixed dose procedure)

Dose	Results	Interpretation
5 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	compounds which are <i>very toxic</i>
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>toxic</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 50 mg/kg
50 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>very toxic</i> ; see results at 5 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>harmful</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 500 mg/kg
500 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>harmful</i> ; see results at 50 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds considered as having no significant acute toxicity
	100% survival; no evident toxicity	see results at 2000 mg/kg
2000 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	see results at 500 mg/kg
	100% survival; with or without evident toxicity	compounds which do not have significant acute toxicity

## **Tossicità per dosi ripetute**

Più che a dosi elevate a seguito di incidenti gli esseri umani possono essere esposti ripetutamente a basse dosi di contaminanti ambientali

Esempi di test con somministrazioni ripetute ad animali da esperimento sono la prova sub-acuta di 28 giorni, il test subcronico di 90 giorni e il test cronico per la durata di vita. Il requisito minimo di solito è la prova di 14 o 28 giorni con ratti.

In base al REACH, è richiesto uno studio di tossicità a dose ripetuta (almeno una prova di 28 giorni) per un livello annuale di produzione o di importazione di 10 tonnellate

Si ottengono informazioni su quelli che sono gli organi bersaglio, relazioni dose/risposta, NOAEL o BDC

Ratti e cani, usualmente giovani (più sensibili)

Table 5.5. Repeated dose studies (28 and 90 d)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	5 to 10 of each sex per group <sup>a</sup>
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> <li>- body weight, food consumption and water consumption</li> <li>- clinical examination. haematological parameters: haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte counts, total and differential leukocyte count, clotting potential; biochemical parameters: including organ function, parameters, electrolyte balance, carbohydrate metabolism, serum salts (Ca, P, Na, K, Cl), glucose, serum enzymes, urea nitrogen, albumen, serum protein, creatinine, bilirubin (lipids, hormones, methaemoglobin, choline-esterase activity), urine analysis</li> <li>- gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy</li> <li>- organ weights</li> <li>- histopathological examination: of all preserved organs and tissues (30 or more) of highest dose and control. If indicated, intermediate and low dose groups</li> </ul>
Results	information concerning effects of repeated dose exposure for parameters measured, target organ(s); if possible, mechanism of action and NOAEL

<sup>a</sup> For a range finding test 5 animals per sex per group may be sufficient for experiments with dogs, usually groups of 4 to 5 animals per sex are used.

Table 5.6. Chronic toxicity studies (6 to 24 months)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	20 (dogs 4 to 5) per sex per group
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> <li>- body weight, food consumption and water consumption during the first 13 weeks at weekly intervals and later at 4 week intervals (body weight) or 3 month intervals (food and water consumption)</li> <li>- clinical examination: haematological and biochemical examination and urine analysis (Table 5.5) at onset of study and at 6 month intervals</li> <li>- gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy</li> <li>- organ weights</li> <li>- histopathological examination in full of all preserved organs and tissues of highest dose and controls. If indicated, of intermediate and lowest dose</li> </ul>
Results	information concerning effects of repeated dose exposure on parameters studied, target organ(s); if possible, mechanism of toxicity and NOAEL