

LEZIONE 16 MARZO- ANALISI CHIMICA TOSSICOLOGICA

L'analisi chimica tossicologica è un ramo della chimica analitica finalizzata ad effettuare l'analisi qualitativa di sostanze tossiche (organiche, inorganiche, metallorganiche, gassose, liquide o solide) presenti nei più disparati ambienti (ambienti, alimenti, cosmetici, ecc.) ricercate per diverse finalità (valutazione dell'inquinamento ambientale, salute dell'uomo, diagnosi mediche)

Quali metodiche analitiche di riferimento esistono? Per i farmaci esiste la **Farmacopea Ufficiale**, testo ufficiale, cioè con valore di legge, compilata da una Commissione nominata dal Ministero della Sanità. In questo testo sono stabilite le caratteristiche e i requisiti che devono essere rispettati per la commercializzazione di composti di carattere farmaceutico. Oltre alle indicazioni della F.U, esistono altri rapporti come quelli forniti dall'Istituto Superiore di Sanità, le metodiche ISO, EPA (agenzia di protezione ambientale degli stati uniti) che hanno fissato la metodica ufficiale per l'esecuzione di un tipo di analisi; per le acque l'APAT fissa determinati requisiti per lo svolgimento dell'analisi delle acque. Partendo dalla Farmacopea Ufficiale, ad oggi la F.U italiana si trova alla 12esima edizione e viene aggiornata da una specifica commissione che opera presso il Ministero della Salute ed ha il compito, ogni tot. Anni di revisionare questo testo perché alcuni farmaci che non sono più in utilizzo vengono eliminati, altri vengono reinseriti e inoltre vengono descritte quelle che sono le principali metodiche per la realizzazione e la fabbricazione dei farmaci e i loro rispettivi controlli di qualità. Nella Farmacopea, suddivisa in capitoli, sono riportate modalità di etichettatura, di conservazione, monografie riferite a specifici prodotti. Oggi nella F.U 12esima edizione, le monografie sono state eliminate perché erano riferite ad ogni singolo farmaco e invece si è preferito rinviare queste singole schede alla Farmacopea Europea. Nella F.U sono inoltre riportate le impurezze non tollerate perché possono provocare attività farmacologiche nocive per l'organismo.

DEFINIZIONE DI VELENO:

Il primo ad aver dato la definizione di veleno è stato Paracelso, una delle figure più rappresentative del Rinascimento. Secondo Paracelso *"tutte le sostanze sono veleni: non c'è alcuna sostanza che non sia un veleno. E' la dose che fa il veleno."* Il manifestarsi di un effetto tossico e la sua intensità dipendono quindi dalla dose. Addirittura l'acqua può dare fenomeni di intossicazione: l'assunzione di più di 10 litri/die possono portare alla morte.

DEFINIZIONE DI SOSTANZA TOSSICA O NOCIVA:

Qualsiasi molecola organica o inorganica, vegetale o animale, solubile o no, semplice o complessa, sintetica o estrattiva, che dopo assunzione in quantità relativamente piccola sia in grado di determinare sull'organismo effetti acuti o cronici mediati da meccanismi specifici (chimici o biochimici).

Qual è la definizione di farmaco? L'OMS ha stabilito che il farmaco è un composto che interagisce attraverso un meccanismo chimico-fisico con il nostro organismo **a beneficio** del paziente. L'OMS ha fissato il bilancio fra rischio e beneficio di un farmaco che per poter essere portato in commercio deve essere notevolmente sbilanciato a favore del beneficio. I farmaci sono dunque composti che determinano il miglioramento dello stato di salute. E allora, da qui, viene fuori, immediatamente, **la definizione di composto tossico/nocivo:** sono quelle molecole che assunte anche in quantità relativamente piccola, modificano il nostro organismo attraverso uno specifico meccanismo chimico-fisico e determinano una condizione di rischio per lo stato di salute.

DEFINIZIONE DI SOSTANZA PERICOLOSA:

Sostanza che può provocare effetti acuti con meccanismi aspecifici (non per sua natura chimica, ma perché ad esempio è esplosivo, infiammabile, irritante, corrosivo, ecc.). L'analisi chimica tossicologica è quindi riferita a composti tossici per il nostro organismo:

GLI XENOBIOTICI:

Composti estranei all'organismo che noi introduciamo dall'esterno attraverso alimentazione, farmaci; lo introduciamo perché tocchiamo un prodotto chimico industriale, quindi entriamo in contatto attraverso la pelle, i polmoni, la via orale o attraverso la via parenterale. Tutte queste molecole possono produrre degli effetti nocivi sugli uomini, sugli animali, sugli ecosistemi. E' stata quindi fatta una classificazione delle

sostanze tossiche:

1. CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE SECONDO LA PROVENIENZA:

- Naturali
- Sintetiche

I microrganismi, le piante e gli animali producono una varietà di sostanze che possono essere tossiche per l'uomo. Ne deriva che il concetto secondo cui le sostanze naturali risultino automaticamente innocue è infondato, basti pensare alla digossina, alla digitossina, cioè ai digitalici, che sono delle molecole il cui effetto farmacologico è tanto potente da poter, a piccole dosi, curare l'insufficienza cardiaca, a grandi dosi, causare l'effetto cardiaco. Ci sono altre sostanze di origine naturale come le tossine prodotte da alcuni funghi, basti pensare alla Amanita phalloides, un fungo estremamente pericoloso in quanto la manitina può portare alla morte. Per questo "naturale" non significa necessariamente sicuro. Le piante, per esempio, producono una larga varietà di composti tossici:

1. Sostanze prodotte come difesa contro gli insetti predatori e le infezioni fungine
2. Sostanze presenti soprattutto nei legumi capaci di inibire l'attività degli enzimi digestivi
3. Più di 200 piante sono note per il loro contenuto in glicosidi cianogenetici che ad opera di opportuni enzimi, rilasciano acido cianidrico (HCN). L'HCN è tossico perché è in grado di bloccare la catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale e quindi porta alla morte dell'individuo per arresto del ciclo respiratorio.

4. Micotossine: molecole prodotte naturalmente da alcune specie di funghi parassiti che crescono e si sviluppano sulle piante in campo o nelle derrate alimentari durante lo stoccaggio. Tra queste vanno ricordate: Le aflatossine, la patulina e l'ocratossina.

Fra le sostanze di sintesi vi sono un gruppo di sostanze:

1. Tutte le sostanze chimiche prodotte a livello industriale
2. Tutti i solventi
3. Tutte le sostanze chimiche per il consumo privato come i detersivi ad uso domestico

Tutte queste sostanze se utilizzate alla dose non opportuna, secondo il concetto di Paracelso, possono trasformarsi in un veleno.

2. CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE SECONDO IL LORO UTILIZZO:

● **farmaci:** superata la dose terapeutica possono determinare effetti tossici. Addirittura alcuni farmaci possono generare degli effetti secondari o collaterali anche alla dose terapeutica, perché ci sono delle persone che hanno alterazioni genetiche che non consentono di poter metabolizzare bene il farmaco o persone che hanno una ridotta capacità di eliminazione del farmaco, ad esempio a causa di disfunzioni renali. In questo caso la posologia (che è una dose misurata ad un individuo sano del peso di circa 70kg : dose media) dev'essere adeguata e modificata a seconda del paziente in esame.

● **additivi alimentari:** sostanze impiegate per migliorare la conservabilità e le caratteristiche organolettiche degli alimenti: conservanti, antiossidanti, coloranti, addensanti, emulsionanti e dolcificanti. Analogamente ai farmaci anche queste sostanze prima dell'immissione sul mercato sono sottoposte per legge ad una serie di esami tossicologici.

● **pesticidi:** appartengono alle sostanze utilizzate per il trattamento delle piante: impiegate contro insetti, acari, vermi, lumache e devono quindi possedere un elevato potere tossico.

● **detersivi domestici:**

1. colori
2. le lacche
3. le colle
4. i solventi per sverniciare

Possono provocare danni per l'uomo e per l'ambiente circostante: non vanno sversati nell'ambiente circostante ma sono definiti rifiuti speciali. Possono causare inoltre avvelenamento immediato in caso di uso smodato e quindi bisogna porre particolare attenzione alla ricerca di residui di questi composti all'interno delle matrici ambientali.

3. CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE SECONDO LA NATURA CHIMICA:

1. composti gassosi e volatili
2. alcali ed acidi
3. metalli e metalloidi
4. composti organici alifatici
5. composti organici aromatici
6. glucosidi

4. CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE SECONDO LA METODICA ANALITICO ASTRATTIVA:

suddivide i tossici in gruppi diversi secondo la possibilità di estrazione della matrice. Ogni metodo estrattivo è in grado di isolare dalla matrice solo un gruppo di sostanze.

5. CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE SECONDO GLI EFFETTI:

1. **Citotossiche:** in grado di provocare lesioni delle cellule dell'organismo e di alterarne una o più funzioni biologiche. Un esempio sono i farmaci per la chemioterapia: essi agiscono uccidendo le cellule eucariote e quindi manifestano un effetto tossico a livello cellulare.
2. **Cancerogene:** capaci di indurre la formazione di tumori. Il danneggiamento del DNA è causa della cancerogenesi
3. **Mutagene:** capaci di modificare il patrimonio genetico che fa sì che ci siano delle alterazioni geneticamente trasmissibili
4. **Teratogene:** inducono malformazioni all'embrione, in quanto agiscono durante il suo sviluppo. Un esempio di teratogenesi riguardava negli anni 70' un farmaco: la talidomide. È stato ritirato immediatamente dal commercio dopo pochi anni, in quanto generava bambini focomelici (cioè con gli arti non formati).
5. **Allergeniche:** bisogna distinguere l'allergia dalla idiosincrasia.
Allergia: io sono allergico ad un composto quando questa molecola viene riconosciuta come estranea dal mio organismo e nei confronti di questa sostanza nel corso di circa 21 giorni si svilupperanno a partire dai macrofagi degli anticorpi. Questi ultimi saranno presenti sui mastociti, cosicché io ad una nuova esposizione a questa sostanza realizzerò una degranolazione dei mastociti, verrà liberata l'istamina e svilupperò immediatamente l'allergia, cioè profonda rinite o manifestazioni bollose sulla superficie corporea. È evidente dunque che per poter essere allergici ad un composto bisogna entrarci in contatto almeno due volte nella vita, perché alla prima somministrazione non dovremmo manifestare alcuna sintomatologia. Alle volte questo avviene in maniera inconsapevole perché alcuni antibiotici ad esempio vengono dati agli animali da allevamento e quindi poi arriveranno alla nostra tavola attraverso gli alimenti, in questo caso corriamo il rischio di essere allergici alla prima somministrazione. Inoltre queste molecole per poter essere riconosciute come non self e quindi estranee all'organismo devono avere un elevato peso molecolare e normalmente i farmaci o piccole sostanze chimiche non hanno questa caratteristica: infatti vengono definiti **apteni** e non allergeni.
Idiosincrasia: condizione di **manca di alcuni enzimi** per la loro biotrasformazione. In questo caso si manifesta subito, alla prima somministrazione un effetto abnorme. Un esempio è una malattia definita favismo dove manca un enzima glucosio 6 fosfato deidrogenasi. Se gli affetti da favismo mangiano le fave, non avendo l'enzima responsabile della trasformazione di una sostanza contenuta nelle fave, possono sviluppare anemia.

IN DEFINITIVA: distinguiamo sostanze tossiche di origine NATURALE E ANTROPICA.

GLI EFFETTI TOSSICI DI UNA SOSTANZA NOCIVA POSSONO ESSERE:

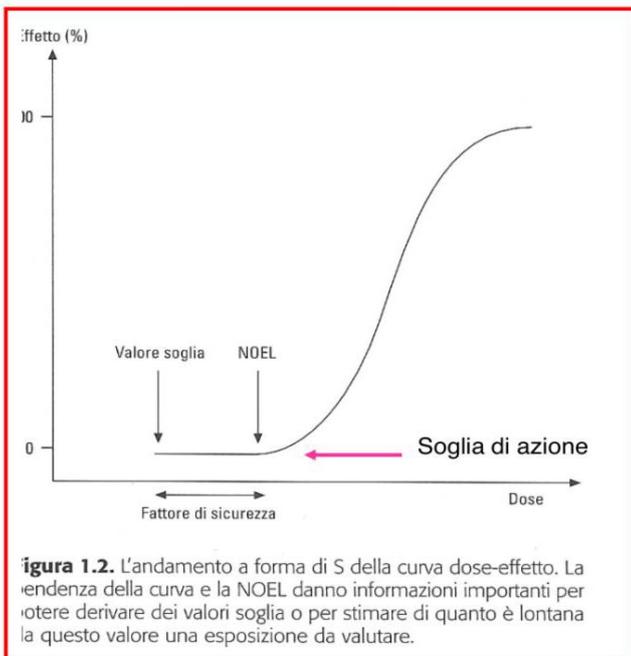
1. **Acuti:** le intossicazioni acute sono di solito dovute ad ingestione di notevoli quantità di un tossico. Danno sintomi gravi ed improvvisi e, se possibile, vanno curati, con l'allontanamento del tossico stesso dall'organismo.
2. **Cronici:** le intossicazioni croniche sono conseguenza dell'assorbimento prolungato nel tempo di basse dosi del tossico. Tale accumulo come ad esempio quello tipico dei metalli pesanti, genera un fenomeno di **BIOMAGNIFICAZIONE** o **BIOACCUMULO**. Man mano questa sostanza che noi non riusciamo ad eliminare si accumulerà all'interno delle cellule fino a raggiungere una concentrazione tale da essere responsabile dell'intossicazione.

GLI EFFETTI DI UNA SOSTANZA NOCIVA PER LA SALUTE POSSONO ESSERE:

1. **reversibili:** capacità delle cellule e delle strutture sub-cellulare che hanno subito un danno di rigenerarsi
2. **Irreversibili:** manca la capacità delle cellule di rigenerarsi (esempio DNA).

Per le sostanze che provocano effetti reversibili è possibile fissare delle concentrazioni o dosi non pericolose; per le sostanze che provocano effetti irreversibili non si può accettare la loro presenza, se pur in concentrazioni ridotte, nel nostro organismo, dunque non si può fissare una soglia di esposizione.

RELAZIONE DOSE-EFFETTO:



Immaginiamo di somministrare una benzodiazepina ad un animale di laboratorio: a concentrazioni molto piccole, nessun animale si addormenta, man mano che aumentiamo la concentrazione, aumenterà la percentuale di effetto fin quando otterremo che il 100% degli animali trattati ad una specifica dose sarà assoggettato all'effetto farmacologico. Ovviamente è esistente anche una relazione **DOSE-TOSSICITA'** se la sostanza che prendiamo in considerazione è un tossico e non un farmaco: perchè abbiamo detto che il farmaco è a beneficio dell'organismo ed il tossico a discapito. Avremo un valore soglia, al di sotto del quale non si manifesta la tossicità. Oltre ad una determinata dose, che si chiama soglia di azione, subentrano gli effetti che aumenteranno di intensità all'aumentare della dose fino al raggiungimento di un tetto (PLATEAU) oltre il quale se

pur incremento ancora la dose, abbiamo già raggiunto il 100% di quello che si potrà realizzare. Subito prima della soglia di azione possiamo fissare il tetto di un parametro definito **"NOEL": NO OBSERVABLE EFFECT LEVEL** (effetti non osservabili) ossia il tetto entro il quale non vedremo assolutamente niente. Normalmente questo parametro viene utilizzato per stabilire qual è il limite di sicurezza della determinata sostanza. Questa curva definita "curva dose effetto" si presenta come una sigmoide in realtà quella che stiamo vedendo non è una sigmoide ma un ramo di iperbole. I composti che hanno una grande tossicità hanno una grande ripidità nella curva, i composti che hanno una bassa tossicità presentano una curva sigmoide poco pronunciata.

2 lezione analisi chimica tossicologica

venerdì 20 marzo 2020

RICAPITOLAZIONE DELLA LEZIONE PRECEDENTE:

Qualunque composto venga ad interagire col nostro organismo, realizzandone un effetto biologico, darà luogo ad una sua attività solo se presente ad una determinata concentrazione. E' evidente che se prendo una dose bassissima di farmaco, non sarò in grado di vederne l'effetto biologico, ma, man mano che incremento la dose, inizierà l'effetto terapeutico nel mio organismo, fino a che all'incrementare di questa dose, si raggiunge un tetto massimo corrispondente al 100%. Questa relazione è una relazione dose-effetto che normalmente dovrebbe essere rappresentata come un ramo di iperbole, perché si parte a dose 0 con effetto 0 e poi tende a salire con una forma iperbolica. Se, però, invece di utilizzare la dose sottoforma di concentrazione, si utilizza il logaritmo della dose, questo tipo di rappresentazione diventa una sigmoide e non più un ramo di iperbole. All'interno di questa sigmoide distinguiamo quindi un tratto più ripido: che è il tratto nel quale si esplica l'incremento lineare dell'effetto rispetto alla dose somministrata e individuiamo poi dei valori:

- **"Valore soglia"** ossia il valore al di sotto del quale non si manifesta alcun effetto nel nostro organismo (se si tratta di un composto tossico, al di sotto del valore soglia non si ha tossicità)
- **"NOEL"** ossia il livello nel quale non si osserva alcun effetto (pure in presenza di una concentrazione bassa di composto tossico, esso non determina effetti nocivi sul nostro organismo)
- **"soglia d'azione"** a livello della quale iniziamo a verificare l'attività del composto tossico e la curva inizierà ad avere un andamento sempre più ripido in ragione della potenza del composto tossico.

Per **"potenza"** si intende il raggiungimento del 50% dell'effetto massimale. "L'efficacia" è invece rappresentata dal valore massimo al quale si può arrivare.

Rispetto alla tossicità di un composto, ovviamente, non tutti gli organismi rispondono allo stesso modo. *Dipende infatti:*

1. Dal soggetto

Un bambino, un adulto, un anziano non hanno la stessa capacità di rispondere ai composti tossici

2. Dal modo in cui si entra in contatto col composto tossico

3. Dall'ambiente nel quale il soggetto viene esposto

4. Dalla natura del composto tossico:

un acido debole introdotto per via orale, potrà determinare degli effetti di tipo sistemico perché un acido debole (es. acido benzoico) potrà esistere nella sua forma protonata o nella sua forma indissociata (COO-), dunque è evidente che se introduco con l'alimentazione l'acido benzoico, esso raggiungendo l'acido cloridico (HCl) presente nello stomaco, si troverà in un ambiente a pH acido e la sua dissociazione da COOH a COO- essendo una reazione all'equilibrio, sarà spostata verso la forma COOH che è la forma più lipofila e quindi sarà più facilmente assorbito.

Un esempio contrario lo si può fare con le *basi organiche deboli*, ad esempio l'anilina. Se introduco per via orale una certa quantità di questa base aromatica, a livello dello stomaco, in presenza di HCl, l'anilina si protonerà ad NH₃⁺ e quindi sarà presente in una forma carica che non è in grado di superare le membrane plasmatiche, il che vuol dire che la molecola non si assorbirà bene a livello dello stomaco e tenderà a non dare effetti sistemici per un assorbimento a livello gastrico.

Il discorso è un po' diverso nel caso di assorbimento intestinale: nell'intestino il pH tende alla neutralità e quindi le basi organiche che non si assorbono nello stomaco, possono essere assorbite a livello intestinale.

5. Dalla dose e dall'esposizione alla sostanza tossica:

Molecole somministrate per due vie di somministrazione diverse, possono dare diverso effetto tossicologico. Basti pensare al *normal-esano* che è un solvente liquido: se inalato porta a perdita di coscienza, se ingerito non ha effetti in acuto.

6. Dalla variabilità biologica

Variazioni sesso, età, razza, peso corporeo danno luogo ad effetti diversi. Un esempio lo si può fare con un farmaco utilizzato nella cura della tubercolosi: *l'isoniazide*. Esso è il principale farmaco antitubercolare che viene commercializzato in Europa e nel resto del mondo ma in dosi differenti. La popolazione Europea, anche definita popolazione Caucasica, ha una capacità di metabolizzazione di questo farmaco (che avviene per reazione di acetilazione) piuttosto lenta; al contrario le popolazioni come Giapponesi, Eschimesi, Russi, Siberiani, vengono