



Numero monografico:

Valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche (a cura di Paola Grenni & Serena Santoro).

M iscele di sostanze chimiche nell'ambiente	2
V alutazione degli effetti combinati delle miscele: una sfida per la salvaguardia della salute dell'uomo e dell'ambiente	3
P roposta metodologica per la gestione delle miscele di sostanze chimiche nell'ambiente	49
A pplicazione del modello di additività di dose / concentrazione a scenari di riferimento italiani	54
I l quadro normativo di riferimento	95
L e miscele nelle linee guida per la valutazione di impatto sanitario: aspetti tossicologici ed ecotossicologici	96
M ateriali di riferimento composti da miscele di sostanze emergenti a supporto dei metodi ecotossicologici (ebm) per la classificazione delle acque superficiali	100
U tilizzo di metodi <i>in silico</i> e <i>read-across</i> per la valutazione di miscele	108
M iscele di sostanze chimiche nell'ambiente: stato dell'arte della valutazione del rischio	117
G li effetti combinati sulla salute umana: approccio valutativo attuale	119
V alutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche: raccolta degli abstract del <i>Digital Workshop</i> .	124

Editoriale

Questo numero speciale del Notiziario è dedicato allo studio svolto nell'ambito di un Accordo di collaborazione, durato 2 anni, tra la Direzione Generale per il Patrimonio Naturalistico del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (ora Ministero della Transizione Ecologica) e l'Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA), dal titolo "Definizione di un approccio metodologico alla valutazione degli effetti combinati delle sostanze chimiche (Valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze)".

Come evento finale, Il Ministero e l'IRSA hanno organizzato il Digital Workshop "Valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche" che si è svolto il 25 giugno 2020. L'evento, rivolto ai rappresentanti delle Amministrazioni pubbliche e agli esperti del mondo produttivo, accademico e della ricerca, ha presentato i risultati dello studio affidato dal Ministero all'IRSA del CNR e ha costituito l'occasione per un confronto e aggiornamento sulla materia, in vista delle azioni che la Commissione Europea avvierà nei prossimi mesi.

Giuseppe Mascolo
Direttore Responsabile

Miscele di sostanze chimiche nell'ambiente

a cura di

Paola Grenni (*), Anna Barra Caracciolo, *Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque, Roma*

Antonio Finizio, *Università degli Studi di Milano – Bicocca, Milano*

Serena Santoro, Susanna Lupi, *Direzione PNM del Ministero della Transizione Ecologica, Roma*

Questo numero del Notiziario è suddiviso in 3 parti: la prima riporta le attività svolte da IRSA-CNR inerenti all'Accordo di collaborazione "Valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze". In particolare viene riportata nei primi capitoli un'analisi critica della letteratura scientifica internazionale più recente, effettuata in collaborazione con l'università degli Studi di Milano-Bicocca, nell'ambito della tematica delle miscele e di quanto ad oggi l'Unione Europea ha proposto per la valutazione del rischio da esposizione contemporanea a più sostanze chimiche. Successivamente viene proposto il modello di additività dose/concentrazione che viene applicato a 5 casi di studio con dati reali di contaminazione e 2 casi di studio con dati di contaminazione previsti considerando ecosistemi fluviali. Viene riportato a titolo di esempio l'applicazione dell'approccio metodologico ad un tratto del fiume Adda, con le relative mappe georeferenziate contenenti i risultati della tossicità delle miscele.

La seconda parte include alcuni capitoli di approfondimento sulle principali tematiche relative alla miscela di sostanze, effettuate da diversi esperti in materia (ISS, ISPRA, Istituto Mario Negri, EFSA).

La terza parte è la raccolta degli *abstract* del Workshop che si è svolto come evento finale dell'attività dell'IRSA-CNR nell'ambito dell'Accordo con il Ministero dell'Ambiente.

Nella prima parte, dall'analisi della letteratura in ambito delle miscele di sostanze chimiche, è emerso che, sebbene sia noto che la sola valutazione degli effetti e dell'esposizione alle singole sostanze chimiche potrebbe non garantire una sufficiente sicurezza per la tutela della salute umana e dell'ambiente, la gestione del rischio attualmente avviene ancora per singoli contaminanti. Nei documenti esaminati vi è una significativa sovrapposibilità degli approcci e dei modelli proposti per la valutazione del rischio da esposizione contemporanea a più sostanze chimiche. La tematica è comunque molto complessa a causa della difficoltà del suo inquadramento (es. origine della miscela), del grande numero di sostanze chimiche coinvolte e della quantità di dati (es. dati di monitoraggio, di tossicologia ed ecotossicologia) necessari per descrivere i *pattern* di esposizione delle sostanze presenti in miscela.

A valle dell'analisi critica e di alcune considerazioni sui diversi approcci, viene proposto, insieme all'Università di Milano Bicocca, il modello di additività dose/concentrazione (conosciuto come *Concentration addition*, CA) per la valutazione e la gestione del rischio da miscele. Tale modello è stato anche condivi-

so con il Gruppo di lavoro costruito ad hoc nell'ambito dell'Accordo. Che vede coinvolti il Ministero, l'IRSA, l'ISS, l'ISPRA e l'Istituto Mario Negri. Il modello *Concentration Addition*, infatti, è quello generalmente riconosciuto a livello europeo nella valutazione teorica del rischio ambientale quando si hanno poche informazioni sulla miscela, e risulta perciò l'approccio di "caso peggiore".

In seguito viene riportata l'applicazione del modello, a valle di una corposa elaborazione, a diversi scenari italiani relativi a dati di monitoraggio ambientale misurati (dati ambientali) o previsti, questi ultimi calcolati mediante modelli.

Viene inoltre riportata, a valle di una corposa elaborazione, l'applicazione del modello a diversi scenari italiani relativi a dati di monitoraggio ambientale misurati (dati ambientali) o previsti, questi ultimi calcolati mediante modelli. Dall'applicazione del modello ai dati previsti, sono stati prodotti i trend annuali delle unità di tossicità delle miscele emesse da scenari agricoli o di un impianto di depurazione.

Nell'ambito dell'Accordo con il Ministero sono state prodotte un numero cospicuo (circa 200) di mappe tematiche che descrivono la potenza di tossicità delle miscele in diversi sistemi lotici italiani. In questo numero monografico del Notiziario viene riportato, a titolo esemplificativo, le elaborazioni del modello relative ad un tratto del fiume Adda.

Il risultato più importante del lavoro svolto è stato quello di mettere in evidenza la presenza di miscele prioritarie (cioè miscele che si ripetono nel tempo e che possono avere valori elevati di tossicità complessiva) e, al tempo stesso, di individuare le sostanze che maggiormente contribuiscono alla potenza della miscela. Tali aspetti sono cruciali al fine di una gestione del rischio delle miscele, potendo intervenire sulle sostanze che realmente governano la potenza della tossicità.

E' stata anche recentemente pubblicata una parte dei risultati qui riportati sulla rivista *Science of the Total Environment* l'applicazione del modello ad un bacino idrografico del Nord Italia (Finizio A, Grenni P, Petrangeli AB, Barra Caracciolo A, Santoro S, Di Guardo A, 2022. Use of large datasets of measured environmental concentrations for the ecological risk assessment of chemical mixtures in Italian streams: A case study. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150614>).

* paola.grenni@irsa.cnr.it

Valutazione degli effetti combinati delle miscele: una sfida per la salvaguardia della salute dell'uomo e dell'ambiente

a cura di

Paola Grenni, Anna Barra Caracciolo (*), *Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Roma*

Antonio Finizio, *Università degli Studi di Milano – Bicocca, Milano*

RIASSUNTO

Ogni giorno sia l'ambiente che l'uomo sono esposti a livelli residuali di centinaia di diverse sostanze chimiche di origine antropica presenti, ad esempio, nelle acque o nei prodotti che consumiamo. La valutazione del rischio dovuto alla presenza di singole sostanze chimiche, senza tenere conto che la reale contaminazione degli ecosistemi sia multipla, potrebbe non garantire un'adeguata valutazione del loro stato di qualità e una sufficiente protezione ambientale. I singoli contaminanti, infatti, possiedono caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche che possono essere differenti e gli effetti combinati di due o più sostanze possono portare ad effetti avversi diversi, e talvolta più gravi, sul biota. Emerge, pertanto, la necessità di una valutazione complessiva dell'esposizione combinata a più sostanze chimiche, che la legislazione attuale sulla tutela dell'uomo e dell'ambiente non considera ancora. La valutazione del rischio da esposizione simultanea ad una miscela di sostanze presenta notevoli difficoltà, principalmente a causa del grande numero di contaminanti coinvolti e della quantità di dati necessari per descrivere i profili tossicologici e i *pattern* di esposizione delle sostanze presenti in miscela.

Dai più attuali documenti di riferimento realizzati dalle maggiori organizzazioni scientifiche internazionali (OECD, WHO, JRC, EFSA, SCHER), nonché pubblicazioni scientifiche internazionali inerenti al problema delle miscele nell'ambiente, si evince che non esiste un approccio unico che sia sufficiente a garantire un adeguato livello di protezione per l'ambiente e per la salute umana. Gli effetti tossici di una miscela possono essere previsti soltanto conoscendone la completa composizione e le interazioni tra i componenti raramente possono essere noti a priori, e vanno valutati caso per caso.

Un aspetto importante è il miglioramento della coerenza degli approcci, tra cui, ad esempio, la logica alla base della scelta di un particolare concetto di tossicità, l'uso di fattori di sicurezza, quando e come tenere conto delle interazioni e l'applicazione di modelli basati sulle emissioni per determinare la co-presenza di sostanze chimiche nei comparti ambientali.

In questo articolo verranno presentate le principali e recenti metodologie per la valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze.

SUMMARY

Environment and humans are exposed every day to residual concentrations of hundreds of different anthropogenic chemicals existing, for example, in water or products we consume. The risk assessment for individual chemicals, without taking into account that the real contamination of ecosystems is multiple, may not guarantee an adequate assessment of their quality status and sufficient environmental protection. The individual contaminants, in fact, have chemical-physical, toxicological and ecotoxicological characteristics that can be different and the combined effects of two or more substances can lead to different, and sometimes more serious, adverse effects on the biota. There is therefore a need for an overall combined exposure assessment to several chemicals, that is not currently taken into account by legislation on the human and environmental protection. The risk assessment of simultaneous exposure to a mixture of substances have several difficulties, mainly due to the large number of contaminants that can be present and the amount of data needed to describe the toxicological profiles and exposure patterns of the substances present in a mixture. From the most current reference documents by the major international scientific organizations (OECD, WHO, JRC, EFSA, SCHER), as well as international scientific publications related to the chemical mixture in the environment, it is clear that there is no a single approach that ensure an adequate protection for the environment and human health. The toxic effects of a mixture can only be predicted knowing its complete composition; moreover the interactions among chemicals is rarely known a priori, and should be assessed case-by-case.

An important aspect is the improvement of the coherence of approaches, including, for example, the rationale for the choice of a particular toxicity concept, the use of safety factors, when and how to take into account interactions and the application of emission-based models to determine the co-presence of chemicals in environmental compartments.

This article will present the main and recent methodologies for the evaluation of the combined effects of chemical mixtures.

* anna.barracaracciolo@irsa.cnr.it

1. INTRODUZIONE

A partire dagli anni '80, in seguito all'aumento delle conoscenze sui fenomeni di inquinamento ambientale e dei loro effetti negativi sugli ecosistemi, sono state introdotte su scala nazionale e internazionale diverse normative volte a prevenire il degrado ambientale derivante dall'uso di sostanze chimiche. Ad esempio, la normativa inerente alla registrazione delle nuove sostanze chimiche e ai prodotti (Regolamento CE 1907/2006, Regolamento REACH), prevede che venga effettuata una valutazione preliminare dei rischi per l'uomo e per l'ambiente prima di una loro immissione sul mercato. Un altro esempio sono i regolamenti in ambito dell'UE che regolano la messa in commercio dei prodotti fitosanitari (Regolamento CE 1107/2009).

Tuttavia, le attuali regolamentazioni si basano sulla gestione del rischio di singoli contaminanti, ma nella realtà gli organismi viventi sono esposti contemporaneamente a più sostanze (miscele) che possiedono caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche estremamente differenti.

Dati di letteratura, per esempio, ci illustrano che in USA un terzo dei 139 corsi d'acqua monitorati contiene 10 o più sostanze chimiche diverse (ormoni sintetici, farmaci, pesticidi, ritardanti di fiamma) (Kolpin et al., 2002); che in Europa sono state riscontrate nel sangue di alcuni parlamentari europei miscele di pesticidi e altre sostanze pericolose (WWF, 2003); in Danimarca i bambini di due anni risultano già esposti a miscele contenenti interferenti endocrini attraverso la catena alimentare, gli abiti e calzature, giocattoli, prodotti per l'igiene, fasciatoi, tappetini da bagno (Tønning et al., 2009); in Italia sono stati rilevati nelle acque 166 differenti pesticidi, spesso in miscela, comprendendo fino a 23 sostanze in solo campione (ISPRA, 2013).

Dunque, la sola valutazione degli effetti e dell'esposizione alle singole sostanze chimiche potrebbe non garantire una sufficiente sicurezza per la tutela della salute umana e dell'ambiente.

Una miscela può essere definita come una qualsiasi combinazione di due o più sostanze chimiche che, indipendentemente dalla loro origine spaziale o temporale, possono influenzare il livello di rischio a cui è soggetta una popolazione o una comunità (US-EPA, 1986). È importante, quindi, conoscere l'origine delle miscele derivanti dall'attività antropica, che possono essere classificate in:

- Miscele da scarichi urbani (contaminanti emergenti quali i farmaci, sostanza organica, etc. principalmente in acqua);
- Miscele da scarichi industriali (es. industria petrolifera, emissione principalmente in acqua o in aria di *by products*);
- Miscele di origine agricola (pesticidi e fertilizzanti in acqua e suolo);
- Miscele da discariche e inceneritori (PCB e diossine in aria, suolo).

Un'altra classificazione delle miscele proposta dalla Commissione Europea nel 2012 (EC, 2012) è la seguente:

- Miscele intenzionali: prodotti formulati come combinazioni di diverse sostanze e vendute/utilizzate come tali (es. prodotti fitosanitari composti da più sostanze);
- Miscele non intenzionali: miscele che si originano da una singola fonte (es. scarico industriale);
- Miscele casuali: miscele che si formano a partire da fonti multiple e diverse vie di contaminazione (es. miscele presenti in corsi d'acqua che derivano da diversi tipi di attività antropiche).

È evidente che la valutazione del rischio da esposizione contemporanea a più sostanze chimiche presenta notevoli difficoltà, principalmente a causa della complessità del suo inquadramento, del grande numero di contaminanti coinvolti e della quantità di dati necessari per descrivere i profili tossicologici e i *pattern* di esposizione delle sostanze presenti in miscela.

La presenza di miscele nell'ambiente e dei suoi potenziali effetti negativi sugli ecosistemi e sulla salute umana ha dunque destato particolare attenzione negli ultimi anni.

Solo recentemente, nell'ambito del Regolamento REACH, è stata adottata nel 2018 una restrizione riguardante gli ftalati DIBP, DBP BBP e DEHP che tiene in considerazione anche gli effetti combinati di queste quattro sostanze (EU, 2015).

2. INDIVIDUAZIONE DELLA LETTERATURA SCIENTIFICA DI RIFERIMENTO E COSTITUZIONE DEL GRUPPO DI LAVORO PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE

Sono numerosi i documenti realizzati da organizzazioni scientifiche internazionali, per la definizione di un approccio scientifico utile alla valutazione e gestione del rischio da miscele per l'uomo e per l'ambiente. È stata fatta una selezione dei documenti e report scientifici ritenuti più significativi e prodotti da organizzazioni scientifiche internazionali al fine di poter selezionare i modelli più appropriati ed utilizzabili, con le informazioni ad oggi a disposizione, per la valutazione della tossicità delle miscele. Nel presente articolo ne sono stati individuati i principali e viene riportata una lettura critica. Ciò fornirà al lettore una visione di insieme su come ci si sta avvicinando alla gestione del rischio da miscele nell'ambiente. Si raccomanda ovviamente la consultazione della documentazione originale a quanti interessati ad approfondire l'argomento. A tal proposito, il lettore troverà nella sezione Riferimenti Bibliografici una numerosa documentazione di approfondimento su questo tema.

Il primo di questi documenti (SCHER SCENIHR SCCS, 2012, *Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*), che è la base anche dei documenti che si sono succeduti, è quello prodotto dai Comitati SCHER (*Scientific Committee on Health and Environmental Risks*), SCENIHR (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*) e SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) della Commissione Europea. Tale documento nasce dall'esigenza della Commissione di valutare se i regolamenti esistenti permettessero di finalizzare la valutazione del rischio da miscela. I tre comitati hanno

espresso il loro parere su questi punti e, più in generale, la loro visione sull'argomento.

I Comitati hanno cercato di rispondere alle seguenti domande:

- esiste un'evidenza scientifica che le sostanze chimiche presenti nelle miscele possano avere un effetto unitario sugli organismi in maniera da influenzare il livello generale di tossicità, ad esempio in termini di additività, antagonismo, potenziamento, sinergismo?
- se i componenti di una miscela di sostanze chimiche possono agire congiuntamente in maniera da influenzare il livello generale di rischio per l'uomo o per l'ambiente, i metodi attuali di valutazione del rischio riescono a tenere adeguatamente conto di questo problema?
- esistono già svariati modelli per valutare gli effetti delle miscele (Additività di dose, azione indipendente ecc.). Quali sono i vantaggi e gli svantaggi di questi diversi approcci? Esiste un modello così robusto da poter essere utilizzato come opzione di default?
- dando per accertato che non è possibile valutare ogni combinazione di sostanze chimiche, quali miscele sono considerate con il più alto rischio per l'uomo e l'ambiente, tali da impegnare maggiori risorse e gli studi su di esse?
- quali sono i punti di maggior carenza di informazioni, nella valutazione della tossicità delle miscele?
- le conoscenze attuali, costituiscono un fondamento sufficientemente solido su cui basare una valutazione della tossicità delle miscele in maniera più sistematica nell'ambito della legislazione europea?

Altri documenti di fondamentale importanza sono quelli dell'Autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA), la quale ritiene che sia prioritario armonizzare le metodologie per la valutazione dell'esposizione a miscele di sostanze chimiche (EFSA, 2018). In questo contesto, alcune unità e panel dell'EFSA hanno intrapreso delle attività a riguardo, partendo dagli approcci già utilizzati per le singole sostanze ed ampliando e armonizzando i metodi per la valutazione del rischio per la salute umana, degli animali e per l'ambiente. Di seguito le principali iniziative:

- nell'ambito del rischio per la salute umana, è stata pubblicata recentemente l'opinione del *Panel on Plant Protection Products and their Residues* (PPR), che descrive come raggruppare i prodotti fitosanitari in "gruppi di valutazione cumulativa" a seconda delle proprietà tossicologiche dei composti (EFSA PPR Panel, 2013a, 2013b). Il *Panel on Contaminants in the Food Chain* (CONTAM) ha pubblicato diverse opinioni che descrivono approcci case-by-case alla valutazione del rischio per la salute umana da miscele utilizzando sia un approccio "Whole mixture" sia un approccio "Component based" (vedi sezioni successive), (EFSA, 2008, 2005; EFSA CONTAM Panel, 2017, 2012, 2011, 2009).
- Nell'ambito della salute animale, il *Panel Additi-*

ves and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) ha pubblicato di recente un parere sulla sicurezza per l'uomo e per l'ambiente e l'efficacia di una miscela di olio essenziale di origano usata come additivo nel mangime (EFSA FEEDAP, 2017). In una valutazione del rischio ambientale di diverse sostanze chimiche, il PPR Panel nella sua *'Scientific Opinion on the Science Behind the Development of a Risk Assessment of Plant Protection Products on Bees (Apis mellifera, Bombus spp. and solitary bees)'* ha sviluppato i diversi approcci per la valutazione del rischio sulle api. Inoltre, l'unità SCER (*Scientific Committee and Emerging Risks*) ha pubblicato il report *'Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations'* (EFSA, 2014; EFSA PPR Panel, 2012a).

- Infine, a febbraio 2019 l'EFSA ha pubblicato una linea guida metodologica (*Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals*) messa a punto per valutare i potenziali effetti da miscela, che integra i requisiti normativi e gli approcci esistenti in ottica di supporto per i valutatori e i gestori del rischio di sostanze chimiche. Questa linea guida (EFSA, 2019) rappresenta sia un riassunto dello stato dell'arte sulla valutazione del rischio delle miscele, sia da guida operativa per la relativa valutazione del rischio. Raccoglie gran parte del lavoro svolto in molti anni di ricerca ed esperienza, e rappresenta un punto di partenza su cui costruire una metodologia più complessa, comprensiva e strutturata.

Anche il Centro Comune di Ricerca della Commissione Europea (meglio conosciuto come JRC, *Joint Research Centre*) ha pubblicato una serie di report (JRC, 2017, 2016, 2015, 2014), il cui obiettivo era quello di chiarire la situazione attuale sulla gestione dei rischi da esposizione a miscele di contaminanti chimici in modo prospettico per future regolamentazioni. Tali documenti sono ripresi in dettaglio anche in pubblicazioni scientifiche pubblicate su riviste internazionali (Bopp et al., 2019; Kienzler et al., 2016).

Anche l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico ha pubblicato un documento (OECD, 2018) che raccoglie quanto raccomandato sia nel convegno OECD *"WHO OECD ILSI/HESI International Workshop on Risk Assessment of Combined Exposures to Multiple Chemicals"* del 2011, sia quanto riportato nelle principali linee guida (es. EFSA, JRC) precedenti. Il documento non fornisce uno schema rigoroso da seguire, in quanto ci sono numerose questioni legislative e/o regolamentari che potrebbero essere disciplinate da diversi approcci, ma fornisce degli orientamenti generali. In particolare, vengono esaminati gli aspetti tecnici per effettuare una valutazione del pericolo potenziale, esposizione e rischio da miscele ed in particolare, vengono effettuate:

- considerazioni sulla formulazione del problema (*problem formulation*), che fornisce gli orientamenti per prioritizzare e orientare la valutazione

dell'esposizione a miscele di sostanze chimiche;

- considerazioni sulla caratterizzazione del pericolo potenziale (*hazard assessment*), per fornire indicazioni sulla valutazione dell'esposizione a miscele di sostanze chimiche;
- considerazioni sulla caratterizzazione della co-esposizione (*exposure assessment*) per fornire indicazioni sui meccanismi che portano a determinati livelli di esposizione alla miscela;
- considerazioni sulla valutazione del rischio da miscele, acquisizione e comunicazione delle incertezze nei risultati: indicazioni sui differenti approcci e acquisizione.

Nei capitoli successivi viene fatta una sintesi dei documenti sopracitati.

Si fa notare che in molti casi i report descrivono approcci e concetti di base e, pertanto, alcuni argomenti si riaffacciano al lettore in maniera ripetitiva. Per quanto possibile, sono state eliminate le parti sovrapponibili (es. trattazione dei modelli di previsione degli effetti di miscela). Tuttavia, in molti casi per garantire la fruibilità del testo non è stato possibile operare un rimando a parti precedenti del testo.

Inoltre è stata stilata una lista delle abbreviazioni che aiuta il lettore nei diversi acronimi utilizzati nel documento.

Infine, è stato costituito un Gruppo di Lavoro, promosso dal Ministero, per condividere la scelta di un modello da poter applicare a casi di studio concreti riguardanti la miscela di sostanze chimiche in ambienti lotici. Per la valutazione delle miscele di sostanze chimiche, è stato condiviso il modello di addittività dose/concentrazione. In particolare è stato ritenuto che tale modello fosse generalmente riconosciuto a livello europeo nella valutazione teorica del rischio ambientale come approccio di "caso peggiore". Tale modello viene anche descritto nel dettaglio.

3. DOCUMENTO SCHER, SCCS, SCENIHR (2012): OPINION ON THE TOXICITY AND ASSESSMENT OF CHEMICAL MIXTURES

3.1 Introduzione

Il documento della Commissione Europea⁽¹⁾ descrive lo stato dell'arte riguardante la presenza delle miscele nell'ambiente, illustrando alcuni principi generali.

Nella prima metà del '900, sono stati identificati tre principi che incidono profondamente sulla tossicità delle miscele. Infatti le sostanze chimiche presenti in miscela possono avere:

- Meccanismo d'azione simile (in questo caso si può considerare l'effetto come derivante da un'addittività di dose/concentrazione);
- Meccanismo d'azione differente (in questo caso i

costituenti della miscela agiscono in maniera indipendente o l'effetto della miscela deriva da un'addittività di risposta/effetti);

- Interazione (in questo caso le sostanze presenti in miscela interagiscono tra di loro e si potrà avere come effetto il sinergismo o antagonismo).

L'addittività di dose/concentrazione avviene quando i componenti della miscela presentano lo stesso meccanismo d'azione. In questo caso, le dosi o le concentrazioni dei singoli componenti sono prima moltiplicate per un fattore di correzione dipendente dalla "potenza" del componente, e poi questi prodotti vengono sommati tra di loro, come riportato nell'equazione sottostante:

$$D_{mix} = \sum_{i=1}^n aD_i$$

dove:

D_{mix} = dose della miscela

aD_i = dose corretta del componente i

L'addittività di dose/concentrazione si basa sull'assunto **che tutte le sostanze presenti in miscela siano raggruppate in maniera omogenea**, ovvero che tutti i componenti della miscela condividano uno specifico meccanismo d'azione, oppure che appartengano al gruppo di contaminanti "baseline" (che espletano cioè un effetto di tipo narcotico).

Sebbene esistano alcune linee guida che descrivono il processo di raggruppamento dei contaminanti in base al meccanismo d'azione, questo viene comunque svolto principalmente sulla base di un giudizio esperto, che valuti caso per caso.

Secondo questo modello, ci si può aspettare un **effetto tossico se la somma delle dosi corrette dei componenti eccede il valore soglia della tossicità della miscela, anche se le dosi delle singole sostanze sono al di sotto delle singole soglie**.

A differenza del modello precedente, il concetto di **addittività di risposta/effetti** implica che i componenti della miscela in esame abbiano meccanismi d'azione differenti l'uno dall'altro, e che non si influenzino a vicenda. In questo caso la tossicità di una miscela si può esprimere come il prodotto delle probabilità che un individuo venga danneggiato a causa dei vari componenti, secondo l'equazione che segue:

$$pM = 1 - (1-p_1) (1-p_2) (1-p_3) \dots (1-p_n)$$

in cui:

pM = risposta della miscela

$p_1, p_2, p_3 \dots$ = risposta dovuta all'esposizione ai singoli componenti presenti alle concentrazioni di studio.

L'equazione può anche essere scritta nel seguente modo:

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(C_i))$$

dove:

$E(C_{mix})$ = effetto della miscela

⁽¹⁾ disponibile al seguente indirizzo:

https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf

$E(C_i)$ = effetto dei singoli componenti quando presenti alle concentrazioni in esame.

Secondo questo modello, ogni sostanza che è presente in miscela in concentrazioni inferiori ad un livello di effetto non contribuisce alla risposta combinata della miscela. Tuttavia, è importante ricordare a questo proposito che indici come NOEL/NOEC (e similari) non sono concentrazioni o dosi in cui non si verifica nessun effetto, ma spesso sono associati a effetti non misurabili nelle condizioni sperimentali, e quindi non si può assumere che il loro contributo alla tossicità di una miscela sia nullo.

Mentre i modelli di additività appena riportati assumono che i componenti della miscela non si influenzino fra loro, i modelli di interazione presuppongono che gli effetti combinati di due o più sostanze in miscela siano maggiori (sinergismo, potenziamento) o minori (antagonismo, inibizione) di quanto emergerebbe sulle basi dei modelli di additività. Questo potrebbe avvenire per interazioni a livello tossicocinetico (es. quando un componente influenza l'assorbimento di un altro oppure compete per siti di trasporto attivo), per interazioni a livello metabolico o tossicodinamico (interazioni fra le risposte biologiche all'esposizione delle diverse sostanze in miscela).

Il grafico di figura 1 (isobologramma) riassume in maniera sintetica le possibili interazioni di due componenti in una miscela.

La Toxic Unit (TU, unità di tossicità) della sostanza A o B rappresenta il rapporto tra la concentrazione della sostanza ed un endpoint ecotossicologico. Ogni curva della Figura 1 rappresenta la possibile combinazione delle concentrazioni di due sostanze A e B che provocano uno stesso livello di effetto (es. LC_{50}).

La curva 1 si riferisce al modello di additività: le sostanze A e B sono perfettamente interscambiabili (all'aumentare di A diminuisce proporzionalmente B). La curva 4 mostra una sinergia: a parità di concentrazione della sostanza A, affinché la miscela abbia lo stesso effetto di quella della curva 1 serve una mino-

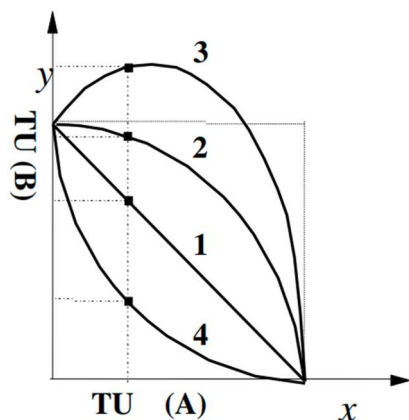


Figura 1. Isobologramma che riassume sinteticamente le possibili interazioni di due componenti in una miscela (miscela binaria) per dar luogo alla potenza della miscela. x, y = frazioni di A e B (due sostanze chimiche). Le quattro linee rappresentano tutti i punti dove la risposta tossicologica alla miscela è pari a 1 TU. (1) risposta additiva: $x+y=1$; (2) meno che additiva: $x+y>1$ (x e $y < 1$); (3) antagonismo: $x+y>1$ (x o $y > 1$); (4) sinergismo: $x+y<1$.

re concentrazione di sostanza B. La curva 2 è speculare alla curva 4, e si riferisce perciò a una risposta meno che additiva. Nella curva 3, per mantenere un effetto costante, è necessario un aumento di concentrazione della sostanza B maggiore di una unità di tossicità (TU = Toxic Unit, rapporto tra la concentrazione della sostanza ed un endpoint ecotossicologico come ad es. LC_{50} ⁽²⁾). Si noti, infatti che a parità di concentrazione è richiesta una concentrazione di B maggiore della sua TU; questo non si verifica sulla curva 2 con la risposta meno che additiva. In questo caso, infatti, la sostanza A riduce la tossicità della sostanza B e si ha un'interazione tra le due sostanze di tipo antagonista.

Secondo il PPR Panel (Panel on plant protection products and their residues) dell'EFSA, interazioni significative (sinergia ed antagonismo) tra le sostanze chimiche avvengono molto meno frequentemente alle dosi di non effetto dei singoli componenti, piuttosto che a concentrazioni maggiori (EFSA 2008a).

In generale, la valutazione degli effetti di miscela a livello ecosistemico è molto più complessa, in quanto l'attenzione si sposta dall'individuo a livelli più alti quali popolazioni, comunità ed ecosistemi, dove gli effetti della miscela possono essere amplificati o mascherati da dinamiche ecologiche come la relazione preda-predatore.

3.2 Metodologie per la caratterizzazione del rischio di miscele

Nella seconda parte, il Documento delle EC si concentra sulle specifiche metodologie sviluppate per valutare effetti ed esposizione delle miscele. Per quanto riguarda gli effetti, viene subito fatta una distinzione fra un approccio "whole-mixture" e un approccio "component based".

Nell'approccio *whole-mixture* si usano le assunzioni e i metodi disponibili per singole sostanze, e la miscela viene considerata proprio come se fosse un unico contaminante. Per poter applicare questo approccio devono essere disponibili dati di tossicità dell'intera miscela, o quantomeno di una miscela molto simile. Questa metodologia ha il vantaggio di tener conto di tutte le componenti non identificate della miscela e di tutte le interazioni che possono avvenire fra le sostanze che la costituiscono. I suoi limiti sono che non può essere applicata a miscele instabili nel tempo.

L'approccio *component-based*, invece, prevede la conoscenza e la caratterizzazione di tutti i componenti di una miscela, in particolare per quanto riguarda il relativo meccanismo d'azione. In assenza di informazioni complete, il concetto di azione indipendente è utilizzato come default in tossicologia umana, mentre quello di additività di dose/concentrazione è più comune nella valutazione del rischio ambientale.

Ci sono 4 metodi per applicare il concetto di additività di dose/concentrazione delle miscele: l'*hazard index*,

⁽²⁾ LC_{50} : Lethal Concentration 50, Concentrazione Letale 50. Il valore LC_{50} è la concentrazione di una sostanza che ucciderebbe il 50% dei soggetti testati dopo una singola esposizione

il *reference point*, il *relative potency factor* e la *toxic unit*.

1) **Hazard index (HI)**: si basa sulla somma degli *Hazard Quotient (HQ)*⁽³⁾, dei singoli componenti calcolati per ogni singola sostanza chimica. Tale approccio tiene in considerazione l'esposizione a più sostanze chimiche, le diverse fonti di esposizione, le diverse vie e scenari di esposizione, attraverso il metodo "dell'additività della dose". Gli HQ si calcolano facendo il rapporto tra l'esposizione e un valore di riferimento (RV, *reference value*) prestabilito. Se $HI < 1$, allora il rischio è accettabile. Il vantaggio di questo metodo è che fa riferimento agli RV, ovvero a indici noti e prestabiliti, rendendo l'approccio semplice e trasparente. Gli RV però includono l'utilizzo di alcuni fattori di incertezza (es. nel calcolo della PNEC⁽⁴⁾) che possono incorporare decisioni politiche o scientifiche di vario genere, e quindi l'HI non è sempre una misura esatta della potenza tossicologica della miscela.

2) **Reference point index (RfPI)**: conosciuto anche come *Point of Departure Index* è la somma delle esposizioni ad ogni componente della miscela, espressa come frazione dei rispettivi *reference points* (punto su una curva dose-risposta corrispondente a un livello di basso effetto stimato o nessun livello di effetto). Se RfPI moltiplicato per un certo fattore di incertezza è < 1 , il rischio è accettabile. Il reciproco di RfPI è il cosiddetto margine di esposizione combinato (MOET, *Combined Margin of Exposure*), in cui il margine di esposizione individuale (MOE) è il rapporto tra RfP e il livello di esposizione nell'uomo (misurato o stimato). Il MOET è calcolato come il reciproco della somma dei reciproci dei MOE individuali. Se il MOET è superiore a 100 o un altro valore alternativo specificato per il MOE dal *risk manager*, il rischio combinato è considerato accettabile.

3) **Relative potency factor (RPF)** (*toxic equivalency factor/potency equivalency factor*): si basa sulla selezione di un singolo componente chiamato "*Index compound*" (*Sind*). Ad ogni sostanza viene assegnato un valore di RPF, calcolato secondo la seguente equazione

$$RPF_1 = TS_1 / T_{Sind}$$

dove:

RPF_1 = RPF della sostanza 1;

TS_1 = tossicità della sostanza 1;

T_{Sind} = tossicità della sostanza indice (o di riferimento).

La dose (concentrazione) viene quindi corretta:

⁽³⁾ HQ: Hazard Quotient, indice di rischio che esprime di quanto l'esposizione alla sostanza supera la dose di riferimento (RfD)

⁽⁴⁾ PNEC: Predicted No Effect Concentration, Concentrazione Prevedibile Priva di Effetti

$$aD_1 = D_1 \times RPF$$

In questo modo, la dose di una miscela per la valutazione del rischio può essere espressa in dosi equivalenti della sostanza di riferimento, secondo la seguente equazione:

$$D_{mix} = \sum_{i=1}^n aD_i$$

dove:

D_{mix} = dose della miscela;

D_i = dose del componente i-esimo.

Una volta trovato il valore di D_{mix} , il rischio può essere valutato usando la curva dose-risposta della sostanza indice. L'RPF è un indice semplice da usare e trasparente, ma dipende molto dalla qualità dei dati di tossicità utilizzati.

4) **Toxic unit (TU)**: è il rapporto fra la concentrazione di un componente in miscela rispetto ad un *end-point* tossicologico di tipo acuto (es. LC_{50}) o cronico (es. NOEC). La *toxic unit* della miscela (TU_m) è la sommatoria delle *toxic unit* dei suoi componenti (TUs). Il concetto di TU permette di quantificare la tossicità di una miscela, per esempio una miscela con $TU_m = 10$ calcolata con la LC_{50} , se viene diluita del 10% causerà il 50% della mortalità. Le TU sono concettualmente simili agli HI, ma mentre gli HI utilizzano dei valori di riferimento che includono fattori di sicurezza, le TU usano concentrazioni ambientali previste (PEC) e valori di tossicità tal quali.

Per quanto riguarda il **modello che considera l'additività di risposta/effetti**, la produttoria (Π), esposta in precedenza, sarà da applicare tal quale (bisognerà avere in questo caso informazioni molto dettagliate sulle curve dose (concentrazione)-risposta di ogni singolo componente della miscela). L'additività di risposta/effetto considera che i vari componenti di una miscela agiscano in maniera indipendente, ma è bene ricordare che, a livello ecologico, gli effetti provocati da due sostanze con modalità d'azione indipendente possono influenzarsi a vicenda anche in maniera indiretta, a causa dei complessi rapporti fra i diversi gruppi tassonomici in una comunità/ecosistema. Attualmente non esistono metodi e modelli che permettano di tenere conto di questo aspetto, e ulteriore lavoro andrà svolto in questa direzione.

Per quanto riguarda **la stima dei livelli di esposizione**, occorre fare una distinzione fra il rischio per la salute umana e il rischio ambientale. Nel primo caso, la stima dell'esposizione è piuttosto semplice soprattutto in ambito occupazionale, in quanto già si dispone di diversi modelli previsionali e strumenti per un'accurata misurazione dei livelli di esposizione. Al di fuori dell'ambito lavorativo, le fonti di esposizione si moltiplicano, e diventa molto più complesso considerarle tutte e fare misurazioni valide e rappresentative. La composizione delle miscele è quindi spesso parzialmente o totalmente ignota, e per valutare l'esposizio-

Albero decisionale per la valutazione del rischio delle miscele

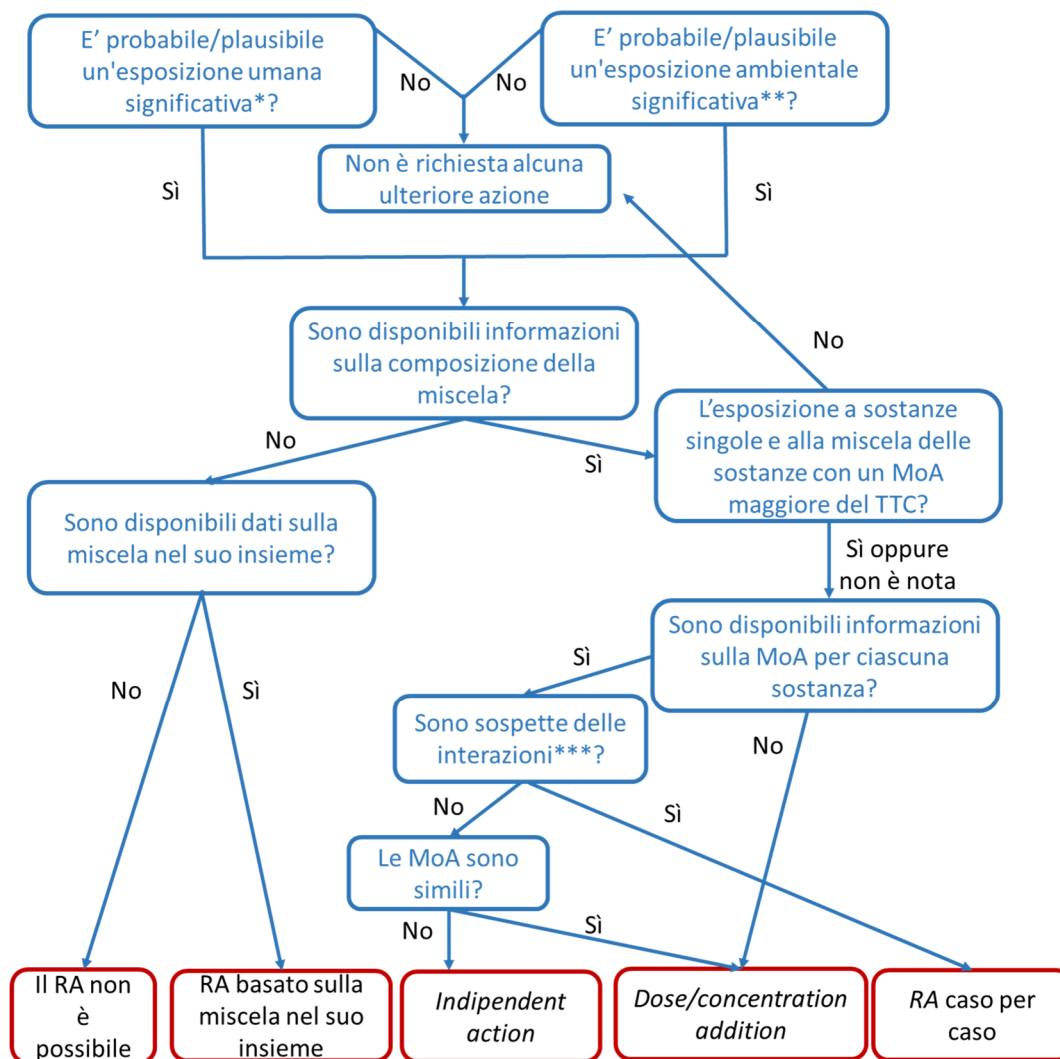


Figura 2. Albero decisionale da seguire per svolgere una corretta valutazione del rischio per le miscele secondo quanto riportato nel documento della Commissione Europea . MOA: Mode of Action, meccanismo di azione; TTC: Threshold of Toxicological Concern, soglia di allarme tossicologico; RA: Risk assessment, valutazione del rischio.

*L'esposizione "significativa" per l'uomo è determinata dalla frequenza, dalla durata e dall'entità di esposizione.

**Per l'ambiente, una valutazione basata sull'esposizione senza almeno una caratterizzazione preliminare del rischio, così come il modello TTC (Threshold of Toxicological Concern- soglia di allarme tossicologico), è difficilmente accettabile. Pertanto, deve essere considerata significativa qualsiasi esposizione dovuta ad emissioni in grado di modificare le condizioni naturali di fondo.

***Prove di interazioni possono essere trovate in vari punti dell'albero decisionale (ad esempio confrontando le informazioni sul prodotto con la valutazione basata sui composti).

ne bisogna affidarsi a modellistica e assunzioni *worst-case* (caso peggiore). Inizialmente si potrà assumere un'esposizione contemporanea massima a tutti i componenti della miscela. Si potrà poi valutare una differenza temporale nelle varie sorgenti di emissione, per poi arrivare a un *higher tier* in cui si prenderanno in considerazione organi e tessuti target ed eventualmente dati di biomonitoraggio.

Per quanto riguarda l'**esposizione ambientale**, la questione è ancora più complessa in quanto in ambiente si possono trovare miscele formate da moltissimi componenti, a causa della molteplicità di fonti di contaminazione presenti. Ogni componente, inoltre, presenta delle proprietà chimico-fisiche molto differenti, e questo porta a un destino ambientale diverso per ogni sostanza, principalmente dettato dalla sua persistenza e dalla sua mobilità. Ne consegue che le mi-

scele in ambiente cambiano continuamente, e sono quindi di difficile caratterizzazione. Un approccio per far fronte a questo problema è quello di raggruppare i componenti delle miscele in gruppi a seconda delle loro proprietà chimico-fisiche di rilievo per il destino ambientale. Una volta creati i raggruppamenti, sarà possibile calcolare delle concentrazioni ambientali dei singoli gruppi, utilizzando misurazioni o la modellistica disponibile per il calcolo delle singole sostanze. Ci possono essere interazioni fra i componenti di una miscela che modificano la degradazione microbica di altri componenti, per esempio competendo come substrati per gli stessi microrganismi oppure stimolando la produzione di enzimi adatti a degradare altre sostanze. Non sono riscontrate, invece, interazioni legate a degradazione fisico-chimica.

È stato riscontrato che in ambiente il numero di componenti che espletano la maggior parte della tossicità delle miscele è sempre piuttosto ridotto. Solitamente, non più di 3-4 sostanze espletano più del 90% della TUm di una miscela, e più una miscela è dannosa minore è il numero di componenti rilevanti.

3.3 Conclusioni del gruppo SCHER, SCCS, SCENIHR

Negli ultimi anni l'attenzione pubblica alla tematica delle miscele è in aumento, e ci si chiede se gli approcci correnti siano sufficienti a garantire un adeguato livello di protezione. Purtroppo, gli effetti tossici di una miscela possono essere predetti soltanto conoscendone la composizione, e questo non è sempre possibile. Anche le interazioni tra i componenti raramente possono essere conosciuti a priori, e vanno valutate caso per caso.

Ad oggi non esistono evidenze scientifiche che le miscele abbiano un effetto tossico quando tutti i suoi componenti sono presenti in concentrazioni con effetto nullo. Se invece questi sono presenti in concentrazioni simili ai valori soglia stabiliti dalla regolamentazione (TDI, PNEC ecc) la situazione può essere diversa.

Per quanto riguarda il rischio per la salute dell'uomo, i valori da linea guida (*Health-Based Guidance Values*, HBGVs) sono derivati utilizzando un grande numero di assunzioni molto conservative, e quindi si ritiene altamente improbabile un effetto tossico di una miscela quando queste soglie non siano sforate dai singoli componenti. Per quanto riguarda l'ambiente invece, i fattori di sicurezza utilizzati non sono così conservativi e l'incertezza è maggiore, quindi non si può escludere un rischio quando i componenti della miscela occorrono in concentrazioni simili alle PNEC.

Alla fine del report, assieme alle risposte alle domande poste alla Commissione Europea che sintetizzano quanto detto, viene proposto un albero decisionale da seguire per svolgere una corretta valutazione del rischio per le miscele (Fig. 2)

4. LINEA GUIDA EFSA (2019): GUIDANCE ON HARMONISED METHODOLOGIES FOR HUMAN HEALTH AND ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT OF COMBINED EXPOSURE TO MULTIPLE CHEMICALS

La linea guida dell'EFSA del 2019⁽⁵⁾ inizia con una dissertazione generale sulla tematica delle miscele, sui principi di base e sulla normativa esistente, che non viene riportata per evitare di ripetere quanto già detto in precedenza.

Dopo questa prima parte, il documento riporta nel dettaglio le varie fasi dell'approccio suggerito da EFSA per la valutazione del rischio da miscele, che consiste principalmente in:

- *Problem formulation*
- Valutazione dell'esposizione
- Valutazione del pericolo

⁽⁵⁾ disponibile al seguente indirizzo:

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2019.5634#efs25634-tbl-0004>

- Caratterizzazione del rischio e analisi delle incertezze.

4.1 *Problem formulation (formulazione del problema)*

Il *problem formulation* è un processo iterativo di scambio di informazione fra i valutatori del rischio e altri attori interessati (tipicamente coloro deputati alla gestione del rischio) per definire gli obiettivi principali per la valutazione del rischio. Inizialmente, viene svolta un'analisi preliminare per capire se esista la possibilità realistica che si possa verificare un'esposizione simultanea a più sostanze; in caso positivo, vengono raccolte le informazioni sulla composizione e sulla tossicità della miscela nel suo complesso e/o dei singoli componenti.

In secondo luogo vi è la creazione del modello concettuale, che include l'identificazione delle sorgenti e vie di contaminazione con cui la miscela entra in contatto con l'uomo o l'ambiente, dell'entità del *target* (specie animali, popolazioni umane, ecosistema ecc.) e il *pattern* di esposizione temporale. In questa fase vengono anche considerati gli eventuali *Terms of Reference* (ToR) della valutazione del rischio, ovvero indicazioni preliminari definite dai gestori del rischio (tipicamente, nel caso dell'EFSA, la Commissione Europea). Se presenti, i ToR possono già fornire la maggior parte delle informazioni necessarie per questo passaggio e per quelli successivi, agevolando significativamente la valutazione del rischio.

Dal modello concettuale viene definito l'approccio metodologico, che dipende ovviamente dalla quantità e dalla qualità dei dati disponibili.

In questa fase viene deciso se utilizzare un approccio *whole-mixture* oppure un approccio *component based*, e in questo caso si deciderà anche quali componenti della miscela considerare ed eventualmente come raggrupparli.

Il raggruppamento è un momento molto importante della valutazione del rischio, ed è determinato dal contesto e dalle finalità con cui si sviluppa il processo di valutazione. È possibile classificare le varie sostanze in base alla loro posizione regolatoria (es. pesticidi, biocidi), oppure in base alla loro sorgente o alle vie di contaminazione.

I metodi più comuni sono comunque il raggruppamento per somiglianza di caratteristiche fisico-chimiche e quello per analogie a livello biologico/tossicologico.

L'ultima parte di questa fase è la creazione di un piano d'analisi che raccoglie il materiale compreso nei *Terms of Reference*, nel modello concettuale e nell'approccio metodologico, e delinea tutte le fasi successive della valutazione del rischio.

4.2 *Valutazione dell'esposizione*

L'esposizione viene valutata in maniera diversa a seconda dell'approccio utilizzato (*whole-mixture* o *component based*).

Nell'approccio *whole-mixture* (miscela considerata come un'unica entità), il primo passo è sempre quello

Tier (livello)	Dati sulla presenza	Dati sul consumo	Stime sull'esposizione
0	Valori di default, Livelli consentiti	Valori di default, dimensione della porzione	Stime semi-quantitative puntuali
1	Dati sperimentali e da modelli	Bilancio alimentare Prodotti alimentari	Deterministico
2	Monitoraggio ambientale	Statistiche riassuntive	Semi-probabilistico
3	Dati singoli di presenza concomitante	Dati singoli	Probabilistico

Figura 3. Secondo quanto riportato nella Linea Guida EFSA, nella valutazione del rischio per le miscele viene seguito un approccio *tier-based* (a livelli successivi). Nota: Range di dati di consumo e presenza che vanno dai valori predefiniti (livello 0) ai singoli dati di co-presenza e ai singoli dati (livello 3); conseguentemente, le stime dell'esposizione vanno dalle stime semi-quantitative (livello 0) a quelle probabilistiche (livello 3). I livelli di presenza e consumo non necessariamente corrispondono.

di caratterizzare la miscela in termini di origine, composizione, persistenza e mobilità nell'ambiente, utilizzando le informazioni reperite durante il *problem formulation* (formulazione del problema). Se la miscela ha poche sostanze rilevanti per la tossicità, queste vanno elencate insieme alla loro concentrazione ed al loro comportamento ambientale.

Successivamente, vengono elaborati i dati di esposizione vera e propria, attraverso misurazioni, modellistica oppure ottenendo informazioni da miscele simili. Nel caso l'esposizione sia per via orale, i dati di consumo vengono utilizzati assieme a quelli di presenza nel cibo o simili per ottenere le quantità assunte dall'uomo o dagli animali.

Infine, vengono riassunti i risultati, comprese le assunzioni fatte, le incertezze incontrate e le conseguenze dei risultati ottenuti sulla valutazione del rischio finale. Se alcuni componenti della miscela ricadono in Regolamenti o restrizioni particolari, le loro concentrazioni andrebbero calcolate e riportate.

Nell'approccio *component based* (basato sui singoli componenti), invece, inizialmente vengono elencate le sostanze divise nei gruppi, selezionati durante il *problem formulation*, assieme ai dati relativi alla tossicità di ciascun componente. Viene anche definita la scala temporale d'interesse per la valutazione dell'esposizione, che dipende dal tipo di dati usati per la valutazione degli effetti (breve periodo per dati acuti o lungo periodo per dati cronici).

Successivamente si elaborano i dati di esposizione, tramite misurazione o modellistica. È molto importante in questa fase comprendere se una esposizione contemporanea a tutte le sostanze considerate sia effettivamente possibile. Se non tutte le componenti sono misurabili in tutti i campionamenti, si può valutare la possibilità di ricavare dei rapporti e delle correlazioni in alcuni punti ed applicarli in altri per coprire i dati mancanti.

Se sono disponibili dati di esposizione e dati di tossicità per ogni componente, si possono calcolare delle dosi corrette per ogni componente secondo il modello di additività di dose/concentrazione. Anche qui, nel

caso di valutazione del rischio per l'uomo o l'animale, i dati di esposizione vanno elaborati assieme a quelli di consumo per ottenere le quantità assunte, che saranno poi utilizzate per la valutazione del rischio.

L'ultimo passaggio di questo approccio è identico alla parte finale dell'approccio illustrato prima, e consiste nella stesura del report finale.

Nella valutazione del rischio per le miscele viene seguito un approccio *tier-based* (a livelli successivi) come nel caso di sostanze singole, ma in questo caso la scelta del *tier* da utilizzare non dipende tanto dai risultati ottenuti agli *step* precedenti, quanto dalla disponibilità di dati sulla miscela o sulle sue componenti. In particolare, si definisce tier0 la valutazione a partire da dati più che altro di default o puntuali, che sono solitamente disponibili, ma se le sostanze in miscela sono ben note e studiate, l'approccio dovrebbe partire da un *tier* più avanzato, con dati probabilistici o studi di monitoraggio, che permettano una disamina più realistica e approfondita dell'esposizione. Uno schema è indicato in figura 3.

4.3 Valutazione del pericolo potenziale

Anche per la valutazione del pericolo, la metodologia varia a seconda che si adotti un approccio *whole-mixture* (utilizzato di solito quando si hanno poche informazioni sulla composizione di una miscela) o un approccio *component based* (usato se i componenti della miscela sono noti e si hanno molti dati a disposizione a riguardo).

In caso di approccio *whole-mixture*, la prima fase consiste nel raccogliere dati di tossicità sulla miscela o, in assenza di questi, su miscele simili per estrapolarne dati sulla miscela in esame (*read-across procedure*).

Successivamente si troverà un *reference point* per la miscela, o individuandolo dalla letteratura (per la miscela in esame o per una simile) oppure derivandolo dai dati di tossicità disponibili (NOEL, LC₅₀ ecc.).

Se i dati sono limitati e di bassa qualità, o se il *read-across* è stato applicato nelle fasi precedenti, si può valutare l'applicazione di ulteriori fattori di incertezza stabiliti secondo il giudizio di un esperto caso per caso, per mantenere una valutazione del rischio cautelativa. Il rapporto fra il *reference point* e il fattore di incertezza è chiamato *reference value*. In alternativa, si può utilizzare l'approccio del margine di esposizione al *reference point*.

Infine, le informazioni che riassumono il pericolo della miscela, le assunzioni fatte per derivarlo e le incertezze incontrate vanno raccolte in un report finale.

L'approccio *component-based* inizia mettendo in discussione il raggruppamento delle sostanze descritto

nel *problem formulation*. Se questo, alla luce delle informazioni raccolte dopo le fasi iniziali della valutazione, risulta inadeguato, andrà modificato e rifinito secondo criteri che comprendono una profonda analisi degli studi di tossicità, modelli tossicocinetici e fisiologici oppure dati meccanicistici da tecnologie omiche e studi *in vitro*.

Una volta confermati o modificati i raggruppamenti dei componenti, vengono raccolte le informazioni rilevanti su ogni componente; queste includono dati di tossicità, *reference point*, *reference values*, modalità d'azione, dati tossicocinetici e relativi *potency factor*. In base a quanti di questi sono disponibili, si identifica il *tier* da cui iniziare la valutazione, in maniera simile a quanto esposto per l'esposizione.

Tabella 1. Tabella riassuntiva dell'intero processo di valutazione del rischio /secondo quanto riportato nella LG EFSA.

Tier	Raggruppamento dei componenti in gruppi di valutazione (AGs, Assessment Groups)	Dati necessari per il raggruppamento	Considerazioni sulla potenza dei componenti	Dati necessari per la valutazione della potenza
0	Inizia con tutte le sostanze chimiche in un gruppo indipendente dal MOA	-	DA/CA di default per tutti i componenti senza raffinamento. In assenza di informazioni per i singoli componenti, considerare la potenza del componente più tossico del gruppo; utilizzare le dosi di riferimento disponibili (PNECs) come punto di partenza, con la consapevolezza che i fattori di incertezza potrebbero variare; si possono applicare i valori di <i>ecoTTC</i> in assenza di dati riferiti alle singole sostanze	Valori di tossicità acuta o cronica (es. alga, dafnia, pesce). Gli endpoint saranno scelti in funzione dell'ambito della valutazione nella formulazione del problema. Utilizzare la PNEC o gli standard di qualità ambientale (EQS) da valutazioni di singole sostanze (le più sensibili per i diversi livelli trofici) come prima approssimazione. Per i composti senza dati, usare l' <i>ecoTTC</i> , o la PNEC del composto più tossico o, ad esempio, le previsioni QSAR
1	Come sopra	-	Valutazione separata per diversi livelli trofici. Potenza raffinata in base ai POD individuali (es., <i>benchmark</i> di tossicità acquatica degli USA o <i>endpoint</i> pertinente). Anziché i rapporti PEC/PNEC, utilizzare le TU	In <i>silico</i> , in vitro, in vivo, a seconda della disponibilità. Utilizzare la PNEC specifica per livello trofico
2	Rifinire gli AGs in base alle informazioni sui MOA per i singoli componenti. Il perfezionamento potrebbe essere quello di dividere tra sostanze chimiche narcotiche e quelle attive. Il raggruppamento potrebbe essere a livello di bersaglio molecolare (ad es. inibitori della colinesterasi)	In <i>silico</i> , in vitro, in vivo, anche omiche	Potenza più rifinita. Effettuare una valutazione separata per diversi livelli trofici	WoE per informazioni tossicologiche disponibili
3	Inserire maggiori informazioni sui MOA	Idealmente informazioni su diversi eventi all'interno di un AOP	Inserire informazioni su TK e TD, utilizzando modelli basati sulla biologia (es. modelli "Dynamic Energy Budget", DEB)	Informazioni TK-TD (es. nessuna concentrazione di effetti, tasso di mortalità, tasso di eliminazione), modello da tradurre in altri modelli di esposizione, specie e esposizione interna*

*Esempi: Baas et al., 2010; Jager et al., 2010. (Gehring and van der Merwe, 2014)

AOP: Adverse Outcome Pathway; DA/CA: Dose Addition/Concentration Addition; MOA: Mode of Action; POD: Point of Departure; TD Toxicodynamic; TK: Toxicokinetic; TU: Toxic Unit; WoE: Weigh of Evidence; TK-TD: Toxicokinetic-Toxicodynamic modelling.



Figura 4. Rappresentazione concettuale del WHO/IPCS per la valutazione del rischio da esposizione combinata a più sostanze chimiche. POD = *point of departure*; RPF=*relative potency factor*; MOA: *Mode of Action* (Documento OECD, 2018).

Successivamente, si valuta la possibilità di un'esposizione combinata, considerando anche i dati di esposizione; si analizzano anche eventuali scostamenti dall'additività di dose per individuare eventuali interazioni fra i componenti. Si identifica anche il metodo migliore per la caratterizzazione del rischio.

A questo punto si identificano i *reference point* e se ne derivano i *reference value* relativi, per ogni componente o per ogni raggruppamento, usando un approccio secondo il *relative potency factor*.

In conclusione, tutte le assunzioni, le incertezze e i risultati trovati vengono riassunti in un report finale.

4.4 Caratterizzazione del rischio

La fase finale della valutazione del rischio consiste nella caratterizzazione di quest'ultimo. In questa parte del processo vengono calcolati i rapporti fra esposizione e pericolo usando i metodi delineati nel *problem formulation* per determinare se c'è un possibile allarme per l'uomo o per l'ambiente.

Inizialmente si confrontano le metodologie usate per la valutazione dell'esposizione e del pericolo, per verificare che siano compatibili tra loro e con le richieste espresse nel piano di analisi predisposto all'inizio della valutazione. Successivamente il rischio viene caratterizzato utilizzando il metodo migliore a seconda del *tier* di valutazione.

Per l'approccio whole-mixture:

- nell'ambito della valutazione del rischio per la salute umana e animale, se è stato definito un valore di riferimento, l'obiettivo è identificare (considerando l'incertezza) se i livelli di esposizione stimata superano il valore di riferimento. In altre parole, tutto questo procedimento si traduce nell'ottenimento di un MoE (*Margin of Exposure*) o un *Hazard Quotient* (HQ) che potrà essere (in)adeguato.

- Nella valutazione di rischio ecologico, invece, la caratterizzazione del rischio si basa sul rapporto PEC/PNEC, o come *higher tier* una valutazione tramite *Species Sensitivity Distribution* (SSD).

Per l'approccio **component based** (basato sui componenti della miscela) si utilizza al *tier0* un *Hazard Index* (HI) per la salute dell'uomo o dell'animale, e un analogo *Risk Index* (RI) per l'ambiente. Al *tier1* si passa a un *Hazard Index* rifinito con un modello *Target Organ Toxicity Dose* (TTD) che considera quali siano gli organi bersaglio del componente in esame, oppure si usa un *Reference Point Index* (RPI). Nella valutazione degli effetti sugli ecosistemi, a questo livello l'approccio più usato è quello delle *toxic units* (TU_m). Al *tier2* si possono usare il *Relative Potency Factor* (RPF) per la salute umana e animale, e le *Species Sensitivity Distribution* possibili includono valutazioni più quantitative e probabilistiche della dose assorbita, giungendo quindi ad approcci "*internal dose hazard index*" per la salute umana e dell'animale o "*Internal Dose Sum of Toxic Units*" (IDTU_m) per l'ambiente.

Successivamente, bisognerà riassumere i risultati della caratterizzazione del rischio con le assunzioni che sono state fatte e le incertezze incontrate.

Infine, bisognerà interpretare i risultati della caratterizzazione del rischio, e valutare se quest'ultimo sia accettabile o no in base ai criteri dettati dagli obiettivi fissati preventivamente dai gestori del rischio. Le incertezze vanno quantificate con esattezza, e in caso di rischio non accettabile, va stilata una lista di informazioni che potrebbero aiutare a rifinire la valutazione e a concluderla con un parere positivo.

Infine, la linea guida presenta una tabella riassuntiva (Tab. 1) che suggerisce l'intero processo di valutazione del rischio.

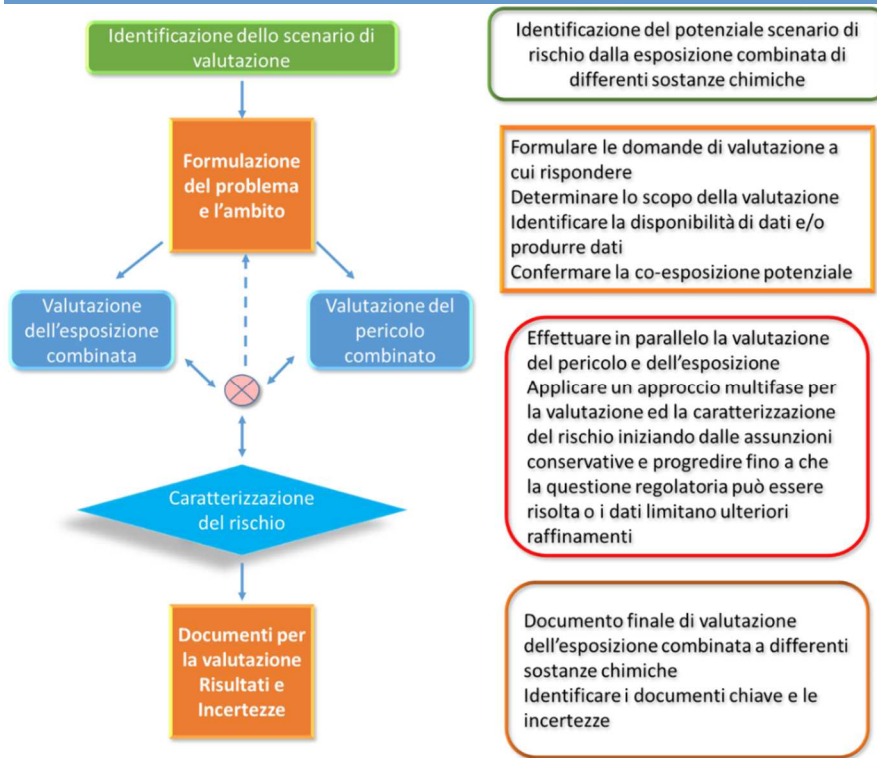


Figura 5. Quadro generale per la valutazione delle esposizioni combinate a più sostanze chimiche (Documento OECD, 2018).

Tabella 2. Perfezionamento per la caratterizzazione del rischio per la valutazione del rischio ambientale con sempre maggiori considerazioni sulla potenza (Documento OECD, 2018)

Tier	Raggruppamento dei componenti in gruppi di valutazione (AGs, Assessment Groups)	Dati necessari per il raggruppamento	Considerazioni sulla potenza dei componenti	Dati necessari per la valutazione della potenza
0	Inizia con tutte le sostanze chimiche in un gruppo indipendente dal MOA			Valori di tossicità acuta o cronica (es. alga, dafnia, pesce). Gli <i>endpoint</i> saranno scelti in funzione dell'ambito della valutazione nella formulazione del problema. Utilizzare la PNEC o gli standard di qualità ambientale (EQS) da valutazioni di singole sostanze (le più sensibili per i diversi livelli trofici) come prima approssimazione. Per i composti senza dati, usare <i>ecoTTC</i> , o PNEC del composto più tossico o, ad esempio, le previsioni QSAR
1			Valutazione separata per diversi livelli trofici. Potenza raffinata in base ai POD individuali (es., <i>benchmark</i> di tossicità acquatica degli USA o <i>endpoint</i> pertinente). Anziché i rapporti PEC/PNEC, utilizzare le TU	In <i>silico</i> , in vitro, in vivo, a seconda della disponibilità. Utilizzare PNEC specifico per livello trofico
2	Rifinire le AGs in base alle informazioni su MOA per i singoli componenti. Il perfezionamento potrebbe essere quello di dividere tra sostanze chimiche narcotiche e quelle attive. Il raggruppamento potrebbe essere a livello di bersaglio molecolare (ad es. inibitori della colinesterasi)	In <i>silico</i> , in vitro, in vivo, anche omiche	Potenza più raffinata. Effettuare una valutazione separata per diversi livelli trofici	WoE per informazioni tossicologiche disponibili
3	Inserire maggiori informazioni sui MOA	Idealmente informazioni su diversi eventi all'interno di un AOP	Inserire informazioni su TK e TD, utilizzando modelli basati sulla biologia (es. modelli "Dynamic Energy Budget", DEB)	Informazioni TKTD (es. nessuna concentrazione di effetti, tasso di mortalità, tasso di eliminazione), modello da tradurre in altri modelli di esposizione, specie e esposizione interna*

5. DOCUMENTO OECD (2018): CONSIDERATIONS FOR ASSESSING THE RISKS OF COMBINED EXPOSURE TO MULTIPLE CHEMICALS

Il documento OECD 2018⁽⁶⁾ è stato scritto a valle del convegno OECD “WHO OECD ILSI/HESI International Workshop on Risk Assessment of Combined Exposures to Multiple Chemicals⁽⁷⁾” del 2011 e di alcune linee guida⁽⁸⁾, sia internazionali dell’OECD, ATSDR, IPCS/WHO e US EPA, canadesi ed Europee.

Il documento non fornisce uno schema rigoroso da seguire, in quanto ci sono numerose questioni legislative o regolamentari che potrebbero essere disciplinate dai diversi approcci, ma fornisce degli orientamenti generali.

Come già detto nei precedenti documenti, i metodi per valutare i rischi derivanti dall’esposizione combinata a più sostanze chimiche possono essere applicati in un approccio a più livelli e seguendo lo schema classico di valutazione del rischio (*problem formulation*, valutazione dell’esposizione e degli effetti, caratterizzazione del rischio). Questo è evidenziato anche nel documento OECD come riportato nelle figure 4 e 5 e nella tabella 2.

Sulla base delle figure sopra citate, nel documento OECD sono riportate una serie di considerazioni che ricalcano fundamentalmente quanto già riportato nei documenti precedentemente analizzati. Qui di seguito una breve sintesi.

5.1 Considerazioni sulla formulazione del problema (*problem formulation*)

In generale, nella fase di *problem formulation* è fon-

⁽⁶⁾ Il documento è disponibile al seguente indirizzo: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/considerations-for-assessing-the-risks-of-combined-exposure-to-multiple-chemicals.pdf>

⁽⁷⁾ OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2011), WHO OECD ILSI/HESI International Workshop on Risk Assessment of Combined Exposures to Multiple Chemicals. Paris, France, OECD Environment Directorate. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 140. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2011\)10&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2011)10&doclanguage=en)

⁽⁸⁾ PNEC: Approaches to Testing and Assessment (IATA, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>); Mutual Acceptance of Data (MAD); Global Portal to Information on Chemical Substances (www.echemportal.org). Further information on IATA related projects are available on the OECD website and information on grouping and read-across in the OECD Guidance on Grouping of Chemicals

(ATSDR, 2004); (ATSDR, 2005); (ATSDR, 2018); (CCME, 2002a); (CCME, 2002b); (CCME, 2010); (CEARO, 1994); (CEPIC, 2010); (CEPIC, 2018); (Price et al., 2012a); (EC, 2005); (EC, 2009a); (EC, 2009b); (ECETOC, 2011); (ECETOC, 2012); (ECETOC, 2016); (ECHA, 2011); (ECHA, 2012); (ECHA, 2013); (ECHA, 2014); (ECHA, 2017a); (ECHA, 2017b); (EFSA PPR Panel, 2008); (EFSA, 2019); (SCHER SCENIHR SCCS, 2012)

damentale lo sviluppo di un modello concettuale per identificare i parametri e gli *endpoint* che saranno utilizzati nella valutazione del rischio. Esso affronta anche quegli aspetti che potrebbero non essere considerati nella valutazione del rischio, ma potrebbero essere importanti nel processo decisionale finale. In particolare:

- Concetti generali per la valutazione del rischio dell’esposizione combinata a più sostanze chimiche. Vengono definiti i dati potenzialmente disponibili, la necessità di generare nuovi dati e soprattutto l’opportunità di condurre una valutazione dell’esposizione combinata⁽⁹⁾.
- Individuare il quesito normativo a cui rispondere e il suo campo di applicazione. Si fa esplicito riferimento al documento “*Decision Tree for the Risk Assessment of Mixtures*” (SCHER SCENIHR SCCS, 2012) precedentemente riportato.
- Determinare la necessità di effettuare una valutazione dell’esposizione combinata. Verifica della co-presenza/co-esposizione e dati per l’evidenza di co-esposizione (provenienti da modelli o da monitoraggio, anche utilizzati insieme). Dati reali: dall’industria, da programmi nazionali compresi i dati di biomonitoraggio; le schede di dati di sicurezza (SDS) o i database dei prodotti. La modellazione può essere utilizzata in alcuni casi per stimare le concentrazioni delle sostanze nei diversi comparti ambientali (ATSDR, 005)

Alcuni esempi di modelli sono:

- modelli di esposizione simultanea ai residui di pesticidi negli alimenti⁽¹⁰⁾;
- modelli per gli additivi alimentari⁽¹¹⁾;
- modelli di esposizioni combinate a sostanze chimiche utilizzate nei prodotti di consumo (Isaacs et al., 2016).

Sono inoltre disponibili diversi modelli per i prodotti di consumo capaci di stimare l’esposizione, in particolare per i prodotti cosmetici e per la cura personale (es. ECETOC, 2016).

5.2 Considerazioni sulla caratterizzazione del pericolo potenziale

Come già evidenziato anche negli altri documenti, gli approcci per la valutazione del rischio possono essere

⁽⁹⁾ Vedi anche *Integrated Approaches to Testing and Assessment –IATA*, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>; “OECD’s Mutual Acceptance of Data-MAD”; divulgazione di informazioni attraverso il portale www.echemportal.org; informazioni sul raggruppamento e il read-across sono riportati nel documento “Guidance on Grouping of Chemicals” (OECD, 2014)

⁽¹⁰⁾ Vedi anche Monte Carlo Risk Assessment Tool-MCRA: <https://mcra.rivm.nl/Account/Login?ReturnUrl=%2f;TheCumulativeandAggregateRiskEvaluationSystemNextGeneration,CARES-NG>, <http://caresng.org/>

⁽¹¹⁾ *Flavourings, Additives, and food Contact materials Exposure Tool, FACET*, <https://expofacts.jrc.ec.europa.eu/facet/>

Tabella 3. Approcci matematici disponibili per la valutazione del rischio di esposizioni combinate utilizzando il concetto di dose addition (Documento OECD, 2018).

Approccio	Formula	Punti di forza	Limitazione	Interpretazione
Hazard Index (HI) Risk Quotient (RQ)	$HQ = Exposure / Reference Value$ $HI = \sum HQ$ $RQ = \sum PEC / PNEC$	Semplice, flessibile e può essere applicato rapidamente; Fornisce un indice trasparente di rischio accettabile; Non richiede la selezione degli stessi endpoint per la selezione del valore di riferimento per ogni sostanza chimica nel gruppo; Contiene diversi dati del gruppo chimico; Fattore di incertezza applicato a ciascuna sostanza chimica del gruppo, se del caso; Consente l'identificazione del contributo % di ciascuna sostanza che può consentire l'identificazione delle sostanze chimiche target per la gestione del rischio	Potenziale di essere eccessivamente conservativo; Ignora le interazioni chimiche; I rapporti PEC/PNEC sono considerati leggermente più conservativi della summazione TU e sono idonei come approccio Livello 1 [SCHER, 2012]; Non si considerano le differenze tossicocinetiche o tossicodinamiche; Difficile razionalizzare la biologia in assenza di informazioni meccanicistiche; Richiede che i valori di riferimento siano disponibili per tutti i membri del gruppo chimico; questi valori spesso non sono disponibili	HI o RQ ≤ 1: rischio combinato accettabile HI o RQ > 1: potenziale preoccupazione
Organo bersaglio (target organ) Indice di pericolo (Hazard index)	$Target\ organ\ HQ = Exposure / TTD$ $Target\ organ\ HI = \sum Target\ organ\ HQ$	Simile all'HI, tranne che si concentra su uno specifico organo bersaglio che può ridurre le sopravvalutazioni del rischio potenziale di tossicità specifica se i valori di riferimento basati su vari endpoint sono utilizzati sull'HI	I valori TTD sono obbligatori per ogni componente per l'organo bersaglio di interesse.	Organo bersaglio HI ≤ 1: rischio combinato accettabile Organo bersaglio HI > 1: potenziale preoccupazione
Point of Departure Index (PODI) o Reference Point Index (RPI)	$PODI = (\sum Exposure / POD) \times UF$	UF: fattore di incertezza del gruppo scelto, di solito un valore predefinito di 100 Somma le esposizioni dei diversi componenti in relazione alle potenze relative; Il gruppo singolo UF o CSAF si applicava al gruppo chimico come ultimo passo nell'approccio che, rispetto all'HI, consente di calcolare la potenza tossicologica della miscela e il contributo di componenti relativi, prima dell'applicazione dei fattori di valutazione	L'interpretazione del PODI (RPI) dipende dal valore dell'UF o CSAF applicato al gruppo; fattore di valutazione del gruppo dovrà tenere conto della variazione tra i DataSet per i diversi componenti. Potenziale sovrastima del rischio.	Se PODI ≤ 1: rischio combinato accettabile PODI > 1: potenziale preoccupazione
Combined Margin of Exposure (MOE(T))	$MOE(T) = 1 / [\sum (1 / MOE)]$	Poiché il MOET è un'estensione di un approccio che viene comunemente utilizzato per la valutazione del rischio di singole sostanze chimiche, potrebbe essere più facile da usare a causa della familiarità del concetto di un "MOE".	Non esistono criteri rigorosi per definire l'entità di un MOE accettabile.	Se il MOET è maggiore di 100 o un altro valore alternativo specificato per il MOE dal Risk Manager, il rischio combinato è considerato accettabile.
Toxic Unit (TU) Summation	$TU_m = \sum TU_s$ $TU = exposure\ concentration / effect\ concentration$	Come gli altri approcci TU può fornire un'indicazione di contributo relativo di ogni sostanza alla tossicità della miscela, che può consentire l'identificazione di sostanze chimiche bersaglio per la gestione del rischio.	Sono necessari per ogni sostanza chimica dati (Eco) tossicologici simili; cioè dati provenienti dallo stesso endpoint (Eco) tossicologico.	Un TU _m letale acuto = 1 significa che la miscela causerebbe 50% di mortalità. Un TU _m letale acuto = 10 significa che una diluizione al 10% della miscela produrrebbe 50% di mortalità.

raggruppati in due classi fondamentalmente diverse:

- whole mixture approaches (WMAs)
- component based approaches (CBAs).

Viene poi selezionato un modello matematico appropriato per il calcolo della tossicità degli effetti dell'esposizione combinata.

Tali modelli sono basati sul meccanismo di azione (MOA) o sulla Adverse Outcome Pathways, percorsi con esito avverso (AOP) delle sostanze.

Sono definiti concettualmente tre tipi di approcci:

- 1) somma delle dosi/concentrazioni (Dose/Concentration Addition, DA-CA);
- 2) somma di risposta (Response Addition-RA)/

azione indipendente (*Independent Action-IA*);

- 3) modelli che tengono conto delle interazioni tra le sostanze in cui una sostanza influisce sulla tossicità di un'altra, che si discostano dai modelli DA/CA o RA/IA.

5.3 Considerazioni sulla caratterizzazione della (co) esposizione

Vengono fornite delle indicazioni per il raggruppamento di sostanze chimiche in categorie di pericolo e/o sottocategorie in base a diversi criteri:

- 1) somiglianze strutturali o in base alla natura delle loro reazioni o su processi di trasformazione o metabolici comuni. Nell'“*OECD Cooperative Chemicals Assessment Programme*”⁽¹²⁾ sono evidenziati i tipi di pericolo per diverse categorie di sostanze chimiche industriali⁽¹³⁾. E' disponibile *on line* un software per la ricerca e il raggruppamento per chemotipi⁽¹⁴⁾. Per i raggruppamenti in base alla degradazione vedi *OECD Guidance Document on Grouping of Chemicals*, (OECD, 2014);
- 2) somiglianze nelle risposte/effetti tossicologici o biologici (NRC, 2008; SCHER SCENIHR SCCS, 2012). Per raggruppare le sostanze chimiche per la valutazione delle esposizioni combinate, vi sono diversi network⁽¹⁵⁾, compresi quelli del documento “*OECD Series on Adverse Outcome Pathways*”⁽¹⁶⁾

5.4 Considerazioni sulla valutazione del rischio da miscele, acquisizione e comunicazione delle incertezze nei risultati: indicazioni sui differenti approcci

Caratterizzare il rischio di esposizioni combinate di più sostanze chimiche ha lo scopo di:

- 1) individuare se sussistono preoccupazioni, come anche evidenziato nella formulazione del problema e nella fase di definizione.
- 2) quantificare l'entità dei rischi dell'esposizione combinata e le condizioni in cui tali rischi possono manifestarsi utilizzando un approccio basato sul peso dell'evidenza che consideri molteplici linee di prova.
- 3) identificare i gruppi di sostanze chimiche che sono fattori di rischio particolarmente importanti che dovrebbero essere presi in considerazione da attività o controlli di gestione del rischio.

Nella tabella 3 sono riportati i principali approcci matematici disponibili che vengono anche di seguito descritti.

L'indice di pericolo (HI- Hazard Index) è uno dei modi più semplici per valutare le esposizioni combinate a più sostanze chimiche. L'HI è uguale alla somma del quoziente di pericolosità di ciascun componente chimico ($HQ = \text{esposizione} \div \text{dose sicura}$). Per la selezione della dose sicura per derivare un HQ, si utilizza:

- per la valutazione del rischio per la salute umana, il DNEL (*Derived No-Effect Level*), l'assunzione giornaliera accettabile (ADI, *Acceptable Daily Intake*), il TTC (*Threshold of Toxicological Concern* - soglia di allarme tossicologico), la RfD (*Reference Dose*, dose di riferimento) o il limite di confidenza della dose inferiore (BMDL - *Benchmark Dose Lower Confidence Limit*).
- per l'ecotossicità, sono frequentemente utilizzati la PNEC (*Predicted No Effect Concentration*, concentrazione di non effetto previsto) gli EQS (*Environmental Quality Standard*, standard di qualità ambientale) o i BMD (*Benchmark Dose*, dose di riferimento); l'HI è tipicamente indicato come il quoziente di rischio (RQ, *Risk Quotient*).

I valori di incertezza sono già inclusi nell'HI e perciò non devono essere applicati (U.S. EPA, 2011).

Nel caso di utilizzo dell'indice di pericolo nel caso di interazioni tra i componenti, l'HI per la miscela è modificato da un fattore di incertezza (un valore predefinito di 10 o un fattore di incertezza derivato dai dati quantificando l'interazione), che viene poi combinato con un peso numerico di Punteggio di prova (WoE-*Weight of Evidence*) (negativo per le interazioni antagonistiche e positivo per il sinergismo). Questo punteggio deriva dalla natura dell'interazione, dalla qualità dei dati disponibili, dalla verosimiglianza biologica/tossicologica dell'interazione alle effettive condizioni di esposizione e dalla rilevanza per salute umana (ATSDR, 2004; Sarigiannis and Hansen, 2012; US EPA, 2007).

È stato sviluppato un secondo metodo che modifica i singoli HQ invece di HI al fine di prendere in considerazione le interazioni binarie e il loro WoE (*BINWOBinary interactions and their WoE*). I BINWOB forniscono una classificazione che indica il tipo di interazione previsto (maggiore di additivo, minore di additivo, additivo o indeterminato) e da un punteggio qualitativo ai dati utilizzando uno schema alfanumerico.

Indice di pericolosità degli organi bersaglio (Target-Organ HI) si tratta di un raffinamento dell'approccio HI, in cui le dosi di tossicità per organi bersaglio (TTD) sono derivate come valori di riferimento specifici per i componenti, anche se questo *endpoint* non è necessariamente l'effetto tossicologico critico. Questi TTD vengono quindi utilizzati per derivare un HI specifico per organo. Ad esempio, i TTD potrebbero essere derivati per gli effetti epatici tra i componenti e un HI specifico per il fegato calcolato sulla base di questi TTD, mentre i valori di riferimento specifici dei componenti

⁽¹²⁾ <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/cocap-cooperative-chemicals-assessment-programme.htm>

⁽¹³⁾ <http://webnet.oecd.org/hpv/ui/Default.aspx>

⁽¹⁴⁾ <https://chemotyper.org>

⁽¹⁵⁾ <https://aopkb.oecd.org/>, <https://aopwiki.org/> e <http://effectopedia.org>)

⁽¹⁶⁾ http://www.oecdilibrary.org/Environment/OCSE-series-on-outcome-pathways_2415170x)

possono essere guidati da diversi livelli di effetti critici (ATSDR, 2004; EFSA, 2013).

L'**indice del punto di partenza** (PODI, *Point of Departure Index*) è la somma dei rapporti di esposizione chimica con il POD per ogni componente chimico in termini di potenza relativa (rispetto a una particolare risposta biologica). Viene applicato un singolo fattore di valutazione di gruppo (un fattore di incertezza predefinito *UF-uncertainty factor* o un fattore di regolazione chimico-specifico-*CSAF-chemical-specific adjustment factor* che può prendere in considerazione sia i dati che gli aspetti politici). L'approccio è stato citato come un metodo più appropriato per calcolare la potenza tossicologica della miscela e il contributo dei componenti relativi, prima dell'applicazione dei fattori di valutazione. Tuttavia, la derivazione di un fattore di valutazione di gruppo dovrà tenere conto della variazione tra i *DataSet* per i diversi componenti (EFSA, 2013).

Il **marginale di esposizione combinato** (MOET, *Combined Margin of Exposure*) è la somma reciproca dei reciproci dei MOE (*Margin of Exposure*) o il reciproco dei PODI (*Point of Departure Index*). Sebbene non esistano criteri rigorosamente stabiliti per definire l'entità di un MOE accettabile (per singole sostanze chimiche o combinazioni), un MOE di valore 100 (che si riferisce a un fattore di incertezza 10x10 per la variabilità inter- e intra-specie) è tipicamente considerato essere il margine minimo accettabile (EFSA, 2013). Il modello **unità di tossicità** (TU) è spesso utilizzato in ecotossicologia per valutare il rapporto tra la concentrazione di un componente in una miscela e l'effetto tossicologico (acuto o cronico), che lo rende concettualmente simile all'HI. Tuttavia, mentre l'HI viene espresso su diversi *endpoint*, la TU viene in genere eseguita su un *endpoint* comune (rendendolo simile al PODI). La TU di una miscela (TUm) è la somma delle TU delle singole sostanze chimiche. Non sono coinvolti fattori di valutazione nel calcolo della somma delle unità tossiche (EFSA PPR Panel, 2012b; SCHER SCENIHR SCCS, 2012).

La **somma delle unità di tossicità interne** (SITU, *Sum of Internal Toxic Units*), chiamato anche il residuo critico nel corpo (*Critical Body Residue*, CBR) è ottenuto sommando unità tossiche interne (in base alle concentrazioni nei tessuti dell'organismo), riferite alle concentrazioni di esposizione esterna (ad esempio in acqua). Un vantaggio di questo approccio è che rappresenta l'assorbimento e il trasporto di una sostanza verso un sito di azione tossica all'interno dell'organismo (Dyer et al., 2000; Escher et al., 2011). Una limitazione importante è che la concentrazione interna spesso non è misurata ma stimata moltiplicando la concentrazione della sostanza nel mezzo ambientale per il suo fattore di bioaccumulo, il che provoca ulteriori incertezze del rischio finale soprattutto se non si considerano i principali meccanismi di disintossicazione o altri parametri tossicocinetici.

L'approccio **fattore di potenza relativa** (RPF, *Relative Potency Factor*), chiamato anche "fattore di scala", utilizza i dati di tossicità per un singolo indice chimico (IC). Si calcola normalizzando le potenze di tutte le sostanze chimiche nella miscela con l'IC (cioè la RPF è derivata utilizzando un rapporto di una dose di rife-

rimento dell'IC a ogni singola sostanza chimica). L'approccio RPF presuppone un analogo modo d'azione e un analogo effetto tossicologico per ciascuna delle singole sostanze chimiche del gruppo e richiede dati sufficienti per individuare una misura comune di effetto al fine di stabilire la potenza relativa.

Vengono evidenziati, inoltre, diversi schemi che non considerano la valutazione a più livelli. Questi includono:

- 1) il documento dell'US-EPA sulle valutazioni cumulative sulla salute (US EPA, 2007), che fornisce approcci per identificare e caratterizzare sistematicamente la situazione dell'esposizione pertinente per la salute umana in una determinata area (chi, quando, quanto?).
- 2) Gli orientamenti dell'EPA statunitense sulla valutazione cumulativa del rischio dei pesticidi che hanno una modalità d'azione comune (US-EPA, 2002). Il documento descrive un approccio graduale sul modo in cui si può prendere una decisione se i pesticidi considerati coesistono e se devono essere compilati in un gruppo di meccanismi comuni (CMG, *Common Mechanism Group*, gruppo di sostanze chimiche che includono un effetto tossico comune da un meccanismo comune di tossicità acuta). I pericoli, l'esposizione e la valutazione dei rischi vengono quindi attuati sulla base di potenze relative, punti di partenza e gli "scenari di esposizione dettagliati".
- 3) Una serie di relazioni e documenti accademici descrivono gli alberi decisionali per orientare l'analisi sugli approcci a miscela intera o i metodi basati sui componenti sono più idonei per valutare quali siano i più idonei e se si raccomandano approcci basati sui componenti e quali debbano essere utilizzati (Price et al., 2012b; SCHER SCENIHR SCCS, 2012; US-EPA, 2000).
- 4) Il sistema di valutazione della tossicità acquatica delle miscele pubblicata dal centro europeo di ecotossicologia e tossicologia delle sostanze chimiche (ECETOC, 2011), che fornisce una panoramica su come individuare le cause degli impatti degli ecosistemi e il ruolo che le miscele svolgono.

Approcci aggiuntivi:

Il rapporto cumulativo massimo (*Maximum Cumulative Ratio*, MCR) è definito come il rapporto tra la tossicità cumulativa e la più grande tossicità da un singolo componente. Non è una misura di tossicità o rischio ma una misura del grado che il rischio di un individuo da un'esposizione combinata è guidato da una singola sostanza chimica. Maggiore è il valore, più il rischio è determinato dalle esposizioni combinate (De Brouwere et al., 2014; Han and Price, 2013, 2011; Price and Han, 2011; Reyes and Price, 2018; Vallotton and Price, 2016).

Gli EQS (*Environmental Quality Standards*: concentrazioni massime di sostanze chimiche pericolose e miscele chimiche nelle acque dolci europee o nei corpi idrici costieri) stabiliti ai sensi della Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE (WFD) potrebbero essere attualmente il più importante esempio europeo di un quadro normativo per una valutazione del rischio che

Tabella 4. Tipi di miscele, caratterizzazione e relativi regolamenti.

Tipo di miscela	Definizione	Caratterizzazione	Valutazione	Es. di regolamento correlato
Intenzionale	Prodotti formulati e commercializzati come tali	Di solito di composizione conosciuta o ben nota	Di solito prospettica basata sulle proprietà dei costituenti inseriti, Se del caso, mediante prove effettuate su tutti i prodotti	fitosanitari, biocidi, prodotti farmaceutici, additivi alimentari ecc.
Involontaria	Di solito da una fonte; generate da scarichi durante la produzione, il trasporto, l'uso o lo smaltimento	La composizione può essere nota (effluente) o sconosciuta	Se composizione sconosciuta, approccio whole mixture	Direttiva quadro sulle acque o la regolamentazione relativa ai rifiuti
Casuale	da varie fonti	Composizione sconosciuta, che varia nel tempo e nello spazio	Generalmente non richiesta	a) regolamento relativo all'acqua/al suolo/all'aria; b) l'esposizione dei lavoratori sul luogo di lavoro, per i quali è richiesta una valutazione del rischio per tutte le sostanze chimiche pericolose, anche in combinazione; c) esposizione degli esseri umani a più sostanze chimiche da alimenti e acqua potabile.

tenga conto delle miscele integrando i pericoli per la salute umana così come per l'ambiente. Gli EQS sono infatti fissati per proteggere non solo gli ecosistemi acquatici, ma anche gli esseri umani che sono esposti attraverso l'acqua potabile e il consumo di prodotti della pesca. I valori di EQS sono stati stabiliti nella Direttiva figlia 2008/105/CE, modificata dalla Direttiva 2013/39/UE e sono stati forniti nel 2011 orientamenti specifici sul calcolo dei valori di EQS per le sostanze che si verificano nelle miscele (EU, 2011). Attualmente, i valori dell'EQS a livello di UE sono fissati per 45 sostanze prioritarie (più altri contaminanti specifici dei bacini idrografici). Di conseguenza, sebbene si possano già avere molte informazioni integrando l'HRA e l'ERA nel contesto delle esposizioni combinate, sarà necessario comunque esaminare, già durante la fase di formulazione del problema, se le valutazioni per la salute umana ed ambientale avranno effettivamente un beneficio l'una dall'altra o se integrando queste valutazioni porterebbero a un eccessivo aumento della complessità, dei tempi e dei costi.

Sebbene sia ancora necessario un certo tempo perché le valutazioni siano pienamente integrate e diventino di comune applicazione, un obiettivo prossimo futuro è quello di migliorare l'armonizzazione dell'HRA e dell'ERA per le esposizioni combinate. L'armonizzazione dovrebbe essere intesa come un miglioramento della coerenza degli approcci, tra cui, ad esempio, la logica alla base della scelta di un particolare concetto di tossicità, l'uso di fattori di sicurezza, quando e come tenere conto delle interazioni, l'applicazione di approcci di modellazione basati sulle emissioni per determinare la co-presenza di sostanze chimiche nei comparti ambientali, ecc..

6. DOCUMENTI PRODOTTI DAL CENTRO COMUNE DI RICERCA (JRC) DELL'UNIONE EUROPEA

In questo capitolo si riporta una sintesi di una serie di

documenti prodotti dal JRC negli ultimi anni⁽¹⁷⁾ che sono stati anche ripresi dalle seguenti pubblicazioni:

- Kienzler A, Bopp SK, van der Linden S, Berggren E, Worth A, 2016, Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. Regul Toxicol Pharmacol. 2016; 80:321-34. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.05.020.
- Stephanie K. Bopp, Aude Kienzler, Andrea-Nicole Richarz, Sander C. van der Linden, Alicia Paini, Nikolaos Parissis & Andrew P. Worth (2019): Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward, Critical Reviews in Toxicology, DOI: 10.1080/10408444.2019.1579169

I documenti prodotti dal JRC sono molto corposi, tuttavia, vengono ripresi molti concetti che sono stati illustrati in precedenza. Pertanto, in questo capitolo ci si limiterà a riportare alcuni punti che non sono stati trattati in precedenza. Ad esempio, nelle Tabelle 4, 5 e 6 ad integrazione di quanto già riportato, si approfondiscono in maniera più dettagliata le diversi tipolo-

⁽¹⁷⁾ JRC, 2014. Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/assessment-mixtures-review-regulatory-requirements-and-guidance>

JRC, 2015. Scientific methodologies for the assessment of combined effects of chemicals - a survey and literature review <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/scientific-methodologies-assessment-combined-effects-chemicals-survey-and-literature-review>

JRC, 2016. Review of case studies on the human and environmental risk assessment of chemical mixtures <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/review-case-studies-human-and-environmental-risk-assessment-chemical-mixtures>

Tabella 5. Requisiti normativi per le miscele intenzionali riportati nei diversi documenti del JRC.

Miscele intenzionali e relativa legislazione	Requisiti regolatori			
	Monitoraggio	RA		Valutazioni della miscela
		HRA	ERA	ERA
Prodotti per la protezione delle piante, PPP (fitosanitari) Reg 1107/2009	No (Ambiente)/ Sì (Residui nel cibo)	Sì	Sì	Il RA per la miscela è necessaria per il PPP (di solito con un approccio di miscela completa, anche se viene promosso anche lo sviluppo di test non su animale per il RARA del prodotto), ma non considera il potenziale uso di diversi PPP in combinazione.
				-Requisito chiaro per la considerazione dei potenziali effetti di miscela dei PPP e dei loro residui su HH attraverso diverse fonti di esposizione: PPP e loro residui "... non deve avere (...) effetti nocivi sulla salute umana, (...), direttamente o attraverso l'acqua potabile (tenendo conto delle sostanze risultanti dal trattamento delle acque), degli alimenti, dei mangimi o dell'aria (...), tenendo conto degli effetti cumulativi e sinergici noti in cui il i metodi accettati dall'autorità per valutare tali effetti sono disponibili "(art. 4, § 3B e § 2a) per il PPP e i loro residui rispettivamente.
Sostanze attive Reg 283/2013 Formulazioni Reg 284/2013	No (Ambiente)/ Sì (Residui nel cibo)	Sì	Sì	-Dovrebbero essere fornite informazioni sufficienti sull'AS e sui co-formulanti, e su uno o più PPP contenenti l'AS, per consentire all'RA del consumatore e "una stima dell'esposizione agli operatori, ai lavoratori, ai residenti e ai passanti" compreso, "se del caso, l'esposizione cumulativa a più di un AS". - Dovrebbe essere menzionata la possibile presenza di residui di pesticidi "da fonti diverse dagli attuali usi fitosanitari di AS (ad esempio l'uso di AS che si traduce in metaboliti comuni, uso come biocida o farmaco veterinario) ", come la necessità di prendere in considerazione la loro l'esposizione aggregata e l'esposizione cumulativa a più di un AS, se del caso (allegato, parte A, punto 6,9; Introduzione all'allegato, punto 1,11).
-No - Non è chiaro se questo requisito sia valido anche per la valutazione dei pericoli e dei rischi per l'ambiente: PPP e loro residui "... non avranno alcun effetto inaccettabile sull'ambiente..." (Articolo 4, § 2 ter e § 3 e), tuttavia, l'articolo 29 del medesimo regolamento stabilisce che "nella valutazione dei prodotti fitosanitari è presa in considerazione l'interazione tra la sostanza attiva, i fitoprotettori, i sinergizzanti e le co-formulazioni", che menziona direttamente sia l'interazione tra componente e la valutazione del PPP (cioè come miscela) senza limitarla alla valutazione della salute umana. ERA è richiesto ma si basa sull'AS e sulla sua PEC in seguito a un uso specifico; non è menzionata la considerazione di altre fonti dello stesso AS o di altri AS provenienti dall'uso concomitante di altri PPP. -Sono incluse tutte le informazioni sugli effetti potenzialmente inaccettabili del prodotto fitosanitario sull'ambiente, sulle piante e sulle produzioni vegetali, nonché gli effetti cumulativi e sinergici conosciuti e attesi "(allegato Introduzione 1,3), ossia dovrebbero essere presi in considerazione gli effetti sull'ambiente cumulativi e sinergici attesi, ma non definiscono in che misura (effetti sinergici tra i componenti dello stesso PPP o con le sostanze chimiche provenienti da altre fonti; effetto cumulativo dall'uso ripetuto del stesso PPP nel tempo o includendo altre fonti, ecc...)				
Biocidi Reg 528/2012	No (ambiente)/ Sì (Residui)	Sì	Sì	Sì - i biocidi devono "non avere alcun effetto immediato o ritardato inaccettabile " su "la salute degli esseri umani (...), o animali, direttamente o attraverso acqua potabile, cibo, mangimi, aria, o attraverso altri effetti indiretti "; e "nessun effetto inaccettabile, o come risultato dei suoi residui, sull'ambiente" (art. 19 § 1). I test di tossicità e il RA sono effettuati sia per l'individuo AS che per i biocidi formulati, presi in considerazione gli effetti "cumulativi e sinergici" (art. 19 § 2); L'allegato III prevede che "per i biocidi destinati ad essere autorizzati per l'uso con altri biocidi, i rischi per la salute umana, la salute degli animali e l'ambiente derivanti dall'uso di queste combinazioni di prodotti sono valutati" (punto 8.5.4). Inoltre, durante il processo di valutazione, quando l'autorità valutatrice ritiene "che vi siano preoccupazioni per la salute umana, la salute degli animali o per l'ambiente a causa degli effetti cumulativi derivanti dall'uso di biocidi contenenti lo stesso o principi attivi diversi ", esso deve essere documentato e incluso nelle sue conclusioni " (art. 8 § 3)

Tabella 5. Requisiti normativi per le miscele intenzionali (seconda parte).

Farmaci umani Dir 2001/83/EC	No	Sì	Sì	L'attenzione è rivolta alle interazioni indesiderate delle sostanze combinate all'interno di un farmaco; interazioni farmacologiche di un medicinale con altri medicinali somministrati in concomitanza; interazioni con alcol, tabacco e prodotti alimentari (allegato I, parte 1, punto 4.2.1, 4.2.2, 5.2.3 e 5.2.4; Articolo 59).	Deve essere effettuata una "valutazione dei potenziali rischi ambientali presentati dal medicinale" (art. 8, § 3 (CA)) che dovrebbe valutare i "possibili rischi per l'ambiente dovuti all'uso e/ o allo smaltimento del medicinale" (allegato I, parte I, punto 1,6); ma non è trattato l'utilizzo di farmaci in combinazione o potenziale interazione
Farmaci veterinari Dir 2001/82/EC	No (ambiente)/ Sì (Residui in generi ali- mentari)	Sì	Sì	I potenziali effetti nocivi per l'uomo dei residui del prodotto o della sostanza nei prodotti alimentari, i rischi potenziali per gli esseri umani direttamente esposti (ad es. durante la somministrazione) sono affrontati	Si presta attenzione alle interazioni con altri farmaci o additivi per mangimi in relazione agli effetti negli animali target; Tuttavia non è presa in considerazione nella valutazione la tossicità ambientale della miscela eventualmente risultante dalla presenza congiunta di diversi residui di prodotti veterinari o dalla presenza congiunta di farmaci e altri inquinanti
Cosmetici Reg 1223/2009	No	Sì	Median- te REACH	<p>Si-in cui " sono considerate tutte le vie tossicologiche significative di assorbimento" e in cui " è data particolare considerazione a qualsiasi possibile impatto sul profilo tossicologico a causa di interazione di sostanze ". Inoltre, deve essere valutata anche la valutazione della sicurezza del prodotto cosmetico stesso (parte B), comprese le possibili interazioni delle sostanze contenute nel prodotto cosmetico.</p> <p>Secondo il Resoconto 33, la valutazione della sicurezza delle sostanze, in particolare quelle classificate come CMR 1A o 1B precedentemente menzionate, dovrebbe considerare l'esposizione complessiva a tali sostanze derivante da tutte le fonti, il che implica lo sviluppo di un approccio armonizzato all'uso di tali stime complessive dell'esposizione</p>	Non trattato
CLP Reg 1272/2008	No	Sì	Sì	Si-limitato alla formulazione stessa, tramite calcolo	Si-limitato alla formulazione stessa, tramite calcolo
REACH Reg 1907/2006	No	Sì	Sì	No - Solo per le sostanze multi-componenti e UVCB, considerate come sostanza singola	No - solo per sostanze multi-componenti e UVCB
Additivi dei cibi Reg 1333/2008	Sì (assunzione)	Sì	No	Non trattato	Non trattato
Additivi per mangi- mi Dir 2001/79/EC, Reg 429/2008	Sì (Residuo)	Sì	Sì	Effetti cumulativi degli usi delle sostanze multi-componenti considerati. Nessuna considerazione di additivi provenienti da fonti diverse.	

Tabella 6. Requisiti normativi per le miscele involontarie, riportati nei diversi documenti del JRC.

Miscele involontarie	Legislazione	Requisiti regolamentatori				
		Monitoraggio	Valutazione del rischio chimico		Valutazione delle miscele	
			HRA	ERA	HRA	ERA
Valutazione di Impatto Ambientale (EIA)	Dir 2011/92/EC	No	Sì	Sì	Deve essere esaminato, ma non specificato in dettaglio	
prevenzione e riduzione integrate dell'inquinamento (IPPC)	Dir 2010/75/EC	Sì	No	No	No	No
Rifiuti e flussi di rifiuti	Dir 2008/98/EC	No, ma si riferisce ad altre normative, es. REACH, IPPC	Si riferisce al CLP	Si riferisce al CLP	No	
Direttiva quadro sulle acque	Dir 2006/60/EC	Sì	Sì	Sì	Menzionato nella linea Guida, ma non esaminato in dettaglio	
Direttive sugli EQS	Dir 2013/39/EU	Sì	No	No RA, ma i QS sono derivati dagli studi ERA	No	Sì
Strategia marina	Dir 2008/56/EC	Sì, con riferimento alla WFD	No	Sì	No	No
Acque potabili	Dir 98/83/EC	Sì	No RA, ma i valori parametrici devono basarsi su un metodo RA	No	No	No
Strategia tematica del suolo - direttiva quadro sul suolo	COM(2006) 231/COM (2006) 232	Sì	Sì	Sì	No	No
Qualità dell'aria ambientale e aria più pulita per l'Europa	Dir 2008/50/EC	Sì	Sì	parzialmente	No	No
Materiale a contatto con gli alimenti	Reg 1935/2004	Sì	Sì	No	No	No
Contaminante alimentare	Reg 315/93/EEC	Sì	Sì	No	No	No
Contaminante dei mangimi	Dir 2002/32/EC	Sì	Sì	Sì	No	No
Residuo Massimo Ammissibile (MRLs)	Reg 396/2005	Sì	Sì	No	Sì(*)	Nessuna menzione della valutazione del rischio ambientale; Tuttavia, nel Reg. 1107/2009, si afferma che i PPP e i loro residui "... non avrà alcun effetto inaccettabile sull'ambiente..." (Art. 4, § 2B e § 3e)
Tutela della salute dei lavoratori	Dir 98/24/EC	Sì	Sì	No	Sì	No
Giocattoli	Dir 2009/48/EC	Sì	No RA ma in riferimento al CLP	No	In riferimento al CLP	No

(*) Si dovrebbe tener conto di: "la possibile presenza di residui di pesticidi derivanti da fonti diverse dagli usi attuali di protezione delle piante di sostanze attive, e i loro effetti cumulativi e sinergici conosciuti, quando sono disponibili i metodi per valutare tali effetti" (Articolo 14 § 2 b); dovrebbero inoltre essere stabilite a livello comunitario misure di sostegno relative agli MRL di pesticidi armonizzati, compresi gli "studi e altre misure necessarie per la preparazione e lo sviluppo della legislazione e degli orientamenti tecnici sui residui di pesticidi, mirano, in particolare, a sviluppare e utilizzare metodi per valutare gli effetti aggregati, cumulativi e sinergici"

Tabella 7. Metodologie utilizzate per la valutazione del rischio di miscele chimiche, riportati nei diversi documenti del JRC.

	Indice di pericolo	Indice di pericolo di interazione	Indice del punto di riferimento	Indice di tossicità dei pesticidi	Indice di potenza relativa (RPF) o fattore di equivalenza (TEF) o fattore di equivalenza della potenza (PEF)	Modello di unità di tossicità (TUs)	Rapporto cumulativo massimo (MCR)
Principio	Somma del coefficiente di pericolosità (HQ: rapporto tra esposizione, sperimentale e rispettivo valore di riferimento, RV) per ogni composto nella miscela	Inserire i dati di interazione disponibili convertendoli in un punteggio numerico (in base al giudizio di esperti o valutazione di WoE)	Somma delle esposizioni (sperimentali) a ciascun composto espressa come frazione del rispettivo punto di riferimento (RP) per l'effetto tossico comune (ad esempio la dose che provoca un effetto del 10%, BMD10; o il NOAEL, ecc...)	Strumento di screening per valutare la potenziale tossicità acquatica delle miscele complesse di pesticidi combinando misure di esposizione ai pesticidi e tossicità acuta in un modello di unità tossica additiva. La PTI è la somma dei quozienti di tossicità per ogni composto di pesticidi (i) misurato in acqua ambiente da un sistema idrologico, per ogni gruppo tassonomico (t).	Somma degli effetti espressi come esposizione totale equivalente per potenza-normalizzando le dosi individuali. Una sostanza è definita come un composto indice (IC) e la potenza di tutte le sostanze chimiche sono normalizzate alla scala di potenza singola dell'IC.	Rapporto tra la concentrazione di un componente in una miscela e il suo endpoint tossicologico acuto o cronico (ad esempio LC50 o NOEC). L'unità tossica di una miscela (TUm) è la somma delle tu di singole sostanze chimiche.	Rapporto tra la tossicità della miscela e la tossicità della sostanza chimica più tossica nella miscela. Pertanto, l'MCR non prevede il rischio, ma fornisce uno strumento per indagare i dati sulle esposizioni cumulative ai recettori umani ed ecologici e identificare i casi per i quali sono maggiormente necessarie le valutazioni cumulative del rischio.
Formula	$HI = \sum HQ$ $= (Exp_1/RV_1) + (Exp_2/RV_2) + (Exp_3/RV_3)...$	$HI_{int} = HI \cdot UF^{WoE}$ - valore di $WoE < 0$ per interazioni antagonistiche e > 0 per sinergismo Valore UF: di default = 10	$RPI = Exp_1/RP_1 + Exp_2/RP_2 + Exp_3/RP_3...$	$PTI_t = \sum_{i=1}^n (E_i/TC_t)$ -E _i = concentrazione del pesticida i, n = numero di pesticidi rilevati in un campione ambientale e TC _t = concentrazione di tossicità per il pesticida i per il gruppo tassonomico t. E e TC sono espressi con la stesse unità di misura.	$D_{mix} = \sum aD_i = \sum D_i \cdot RPF_i$ con $RPF_i = TS_i/T_{ID}$	$TU_m = \sum TU_s$	$MCR = TU_m / \text{Highest individual TU}$ $1 < MCR < n$ n=numero di sostanze chimiche nella miscela
Interpretazione	- HI < 1: rischio combinato accettabile - HI > 1: potenziale problema sanitario da considerare.	- HI < 1: rischio combinato accettabile - HI > 1: potenziale problema sanitario da considerare.	Se RPI*UF < 1: rischio combinato accettabile (UF: fattore di incertezza di gruppo scelto, di solito un valore predefinito di 100)	La mortalità di <i>Ceriodaphnia dubia</i> è stata osservata per il valore PTI compreso tra 0,1 e 100	-Effetto sanitario della miscela valutata segnalando il Dmix sulla curva dose-risposta dell'IC. Il Dmix può essere prontamente confrontato con l'HBGV	-Utilizzato per quantificare la tossicità di una miscela sulla base della sua composizione. Un TUm letale acuto = 10 significa che una diluizione del 10% della miscela produrrebbe 50% di mortalità.	MCR ≈ 1: una sostanza chimica domina completamente la tossicità; MCR ≈ "n": ogni sostanza chimica è presente in concentrazioni "equitossiche". L'MCR indica la quantità di un singolo CR perso non facendo una CRA: MCR = 4 → un approccio sostanza-sostanza potrebbe sottovalutare la tossicità di una miscela di un fattore di 4. MCR è la misura della frazione di tossicità che proviene dal componente più tossico: MCR = 2 → 1 sostanza sta dando il 50% della tossicità della miscela, MCR = 1.1 → 1 sostanza chimica sta fornendo il 90% della tossicità della miscela

Tabella 7. Metodologie utilizzate per la valutazione del rischio di miscele chimiche (seconda parte).

<p>Vantaggio</p>	<p>-È direttamente correlato a un RV, un indice di rischio accettabile ampiamente utilizzato e ben compreso</p> <p>- Può essere applicato velocemente</p> <p>-Può contenere l'applicazione di CSAFs all'inizio del processo</p>	<p>Tiene conto della natura dell'interazione (sinergismo/ antagonismo), della qualità dei dati, dell'attendibilità dell'interazione in condizioni di esposizione, dell'importanza per la salute umana</p>	<p>Somma le esposizioni dei diversi componenti in relazione alle loro potenze relative</p> <p>-Un singolo gruppo UF può essere applicato come ultima fase nel processo</p> <p>-CSAFs può essere applicato se necessario.</p>	<p>Indicatore relativo, ma quantitativo di potenziale tossicità che può essere usato in un disegno di studio o per interpretare i dati di qualità dell'acqua, correlare l'esposizione dei pesticidi alla condizione biologica e dare priorità alle valutazioni future. Può essere applicato alle miscele di pesticidi rilevate in campioni d'acqua ambientali da utilizzare per classificare i siti in base alla loro potenziale tossicità relativa prevista nel tempo in un singolo sito</p>	<p>Metodo trasparente, facile da capire, perché separa la correzione della potenza dalla considerazione dell'esposizione.</p>	<p>-Si riferisce ad un endpoint tossicologico</p> <p>-Se la forma della curva è nota, TUm può essere utilizzato per stimare l'effetto atteso</p>	<p>-Consente di decidere se è necessaria una valutazione cumulativa per una miscela</p> <p>-Può essere integrato in approcci a più livelli per valutare le miscele</p>
<p>Svantaggi</p>	<p>-RVs ottenuta per applicazione di un UF che potrebbe incorporare giudizi politici e scientifici: → non rappresenta una vera misura della potenza tossicologica relativa dei composti.</p> <p>-Richiede che l'HBGV sia disponibile per tutti i membri del gruppo di valutazione, il che spesso non avviene</p>	<p>-Fornisce solo un punteggio numerico del rischio potenziale</p> <p>-HI e Hlint sono fortemente influenzati da una valutazione soggettiva</p> <p>-Le incertezze intrinseche che influenzano i RV sono combinate e amplificate in derivazione Hlint</p>	<p>L'interpretazione dei risultati si basa sul valore dell'UF, per il quale i criteri sono indefiniti</p>	<p>-Sistema di classificazione relativo che indica che un campione è probabilmente più/meno tossico Tan un altro, ma non indica che la tossicità si verificherà necessariamente</p> <p>-Non riflette l'esposizione a lungo termine/cronica o incorpora endpoint subletale; e non considera i fattori ambientali (pH, T °...) che possono influenzare la tossicità e la biodisponibilità dei pesticidi -Non prende in considerazione l'interazione</p>	<p>La determinazione del rischio dall'esposizione combinata pone grande enfasi sulla qualità della banca dati tossicologica dell'IC</p>	<p>Non si riferisce all'ecosistema, ma solo ad un organismo specifico assunto per essere rappresentativo di un gruppo di organismi ecologicamente o tassonomicamente rilevanti per l'ecosistema.</p>	<p>-I dati analizzati finora sono limitati, si deve fare più lavoro per convalidare il modello</p> <p>-Come prevedere i valori MCR per le sostanze chimiche non ancora sul mercato?</p>

Tabella 7. Metodologie utilizzate per la valutazione del rischio di miscele chimiche (terza parte).

<p style="text-align: center;">Nota</p>	<p>-Un HI rettificato (aHI) può essere calcolato quando l'UF utilizzato per derivare l'RV è in parte estraneo all'effetto tossico comune (Boobis et al., 2008).</p> <p>-Approccio preferenziale quando non sono disponibili informazioni meccanistiche ampie</p> <p>-È stato elaborato un perfezionamento del metodo di pericolo, il metodo della dose di tossicità per organ bersaglio (TTD), al fine di soddisfare la valutazione delle miscele i cui componenti non hanno tutti lo stesso effetto critico e tenere conto della realtà che la maggior parte dei componenti di le miscele correlate al sito di rifiuti colpiscono altri organi a dosi superiori a quelle che causano gli effetti critici (Mumtaz et al., 1997)</p>	<p>Possono essere introdotti anche un fattore aggiuntivo (M, rapporto tra la dose efficace osservata (ED) e l'ED previsto dall'approccio di addizione della dose), per includere una valutazione quantitativa dell'interazione</p>	<p>Reciproco dell'RPI: margine di esposizione combinato $MOET = 1/[(1/MOE_1)+(1/MOE_2)+(1/MOE_3)...]$</p> <p>con $MOE=RP /Exp$</p> <p>Quando il $MOET > 100$ (o altro valore ritenuto appropriato dal Risk Manager) il rischio combinato di esposizione al composto è considerato accettabile.</p>	<p>-Strumento per la valutazione delle miscele di pesticidi: l'PTI è un indicatore della potenziale tossicità delle miscele di pesticidi per la vita acquatica</p> <p>Se calcolato a partire da valori di tossicità mediana per i singoli pesticidi, è robusto per gli outlier ed è appropriato per confrontare la tossicità potenziale relativa tra campioni, siti o pesticidi. Se calcolato utilizzando il 5 ° percentile dei valori di tossicità disponibili, si tratta di un indicatore del livello di screening più sensibile di potenziale tossicità</p> <p>Il PTI è un indicatore relativo, ma quantitativo, di potenziale tossicità che può essere utilizzato per valutare le relazioni tra l'esposizione dei pesticidi e la condizione biologica</p>	<p>-Il fattore di equivalenza tossica (TEF) è un caso speciale di questo metodo, inizialmente sviluppato per le diossine e altri agonisti del recettore dell'idrocarburo arilico (AhR).</p> <p>-Il fattore di equivalenza di potenza è un metodo più generale che è stato utilizzato per composti come idrocarburi policiclici aromatici e alcuni pesticidi.</p>	<p>Frequentemente utilizzato in ecotossicologia. TUm è paragonabile a HI se applicato alle conc. ambientali, ma riferendosi a un endpoint Tox. e non all'RV. L'RV in ecotox è il PNEC, perciò il rapporto $\sum PEC/PNEC$ potrebbe essere paragonabile ad HI; Tuttavia, la PEC/PNEC per i componenti di una miscela potrebbe non essere omogenea in quanto la PNEC viene determinata applicando un AF agli endpoint Tox. ottenuti per gli organismi più sensibili, che possono essere diversi per ogni sostanza chimica nella miscela. Tuttavia, questo approccio è noto per essere leggermente più conservativo rispetto a $\sum TUs$ e potrebbe essere utilizzato come primo livello quando si applica CA</p>	<p>Valori bassi MCR implicano modelli additivi e indipendenza darà stime simili di Tox. (quando una sostanza chimica è il conducente di una miscela Tox. entrambi i modelli danno risposte simili)</p> <p>Valori elevati di MCR implicano che le risposte dei due modelli saranno diverse, vale a dire che è più importante stabilire "gruppi di valutazione" in cui si verifica l'addizionalità della dose. È stato dimostrato empiricamente che la MCR è inversamente correlata alla potenza tossica della miscela: la miscela molto pericolosa è guidata da pochissime sostanze chimiche</p> <p>Può essere applicato ai dati di biomonitoraggio con la seguente equazione (basata sull'esposizione):</p> <p>$MCR = \text{totale TEQ} / \text{massima TEQ} = \sum (\text{Conc.} * \text{TEF}) / \text{Max (conc.} * \text{TEF)}$</p> <p>TEQ: equivalenti di tossicità, TEF: fattori equivalenti di tossicità</p>
--	---	--	--	---	--	---	---

Tabella 8. Possibile utilizzo di nuove metodologie a supporto della valutazione dei pericoli e dei rischi delle miscele chimiche, riportati nei diversi documenti del JRC.

Strumento	Può essere utilizzato per
Metodi in vitro	<ul style="list-style-type: none"> • prevedere il pericolo dei singoli composti e delle loro combinazioni • valutare molti composti in modo rapido ed efficiente in termini di costi, senza test sugli animali • testare miscele intere e supportare il monitoraggio basato sugli effetti • indagare i MoA e per il raggruppamento basato sui MoA • valutare il presupposto della additività di concentrazione a basse dosi
Omiche (trascrittomica, proteomica, metabolomica)	<ul style="list-style-type: none"> • indagare le vie interessate per rivelare le MoA • indagare sulle possibili interazioni (antagonismi o sinergie)
QSAR (<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • prevedere le informazioni (mancanti) sui singoli composti (proprietà chimico-fisiche, effetti tossicologici) • prevedere gli effetti combinati e le interazioni delle sostanze chimiche in una miscela • supportare il raggruppamento di sostanze chimiche e valutare se agiscono in modo simile o diverso
TTC (<i>Threshold of Toxicological Concern</i> - soglia di allarme tossicologico) o ecoTTC	<ul style="list-style-type: none"> • stabilire valori conservativi (livelli di esposizione sicuri) in assenza di dati di tossicità specifici
Read-Across	<ul style="list-style-type: none"> • prevedere le informazioni mancanti per i componenti di una miscela non testati in un approccio basato su componenti • read-across per gli effetti di miscele simili in un approccio di miscela considerata un tutt'uno • Maggiori info: https://echa.europa.eu/it/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/grouping-of-substances-and-read-across
Modelli TK	<ul style="list-style-type: none"> • modello di esposizione interna • valutare il potenziale/probabilità per la co-esposizione interna • prevedere le potenziali interazioni TK tra i componenti della miscela • agevolare l'uso dei dati HBM nella valutazione del rischio tossicologico

gie di miscela. Inoltre in Tabella 7 sono riportate schematicamente le possibili metodologie da utilizzare nella valutazione del rischio da miscela.

Dal punto di vista della potenziale gestione del rischio da miscela, nei documenti prodotti dal JRC è molto utile la descrizione di strumenti di analisi valutativa della miscela; tra questi il *Maximum Cumulative Ratio (MCR)* è il rapporto tra la tossicità della miscela (basata su modelli CA) e la tossicità della sostanza chimica che contribuisce maggiormente alla sua tossicità. L'approccio MCR è attualmente applicato in vari contesti. Ad esempio, può essere utile a decidere sulle fasi successive della valutazione del rischio (RA): se intraprendere ulteriori studi sulla miscela o concentrarsi solo su pochi componenti che determinano gli effetti. Ovviamente, per calcolare il MCR, deve essere eseguita almeno un RA di *screening* della miscela. Inoltre, l'applicazione della metodologia MCR richiede la conoscenza delle concentrazioni delle sostanze chimiche nella miscela insieme ai valori di riferimento di base sulla salute per tali sostanze chimiche.

Inoltre, nei documenti JRC, vengono approfonditi i potenziali nuovi approcci e metodi scientifici per la valutazione dei pericoli di miscele, in particolare sulla possibilità di utilizzare, ad esempio, studi di tossicità *in silico*, *in vitro* o, dove necessario, *in vivo*.

Le metodologie sono riportate in Tabella 8. Un modo sempre più diffuso di integrare e interpretare i dati sui pericoli consiste nell'utilizzare il *Framework del pathway* (Figura 6) dei risultati avversi (AOP). Questo fornisce un mezzo per fissare le conoscenze esistenti riguardanti il collegamento tramite eventi chiave (KE) tra un evento di Interazioni molecolari iniziali (MIE) e un esito avverso (AO), a un livello di organizzazione biologica pertinente alla valutazione dei pericoli e/o dei rischi (Ankley et al., 2010; OECD, 2013). Sebbene sia importante comprendere le relazioni quantitative tra le KE a monte e l'AO per utilizzare in modo affidabile gli AOP per stimare il rischio, gli AOP qualitativi sono già utilizzati per supportare la valutazione dei pericoli delle singole sostanze chimiche in un contesto normativo (Andersson et al., 2018).

Gli AOP possono formare delle reti che comprendono più sostanze chimiche ed *endpoint*, sostenendo così la valutazione dei pericoli delle miscele chimiche.

Le reti AOP forniscono un quadro per la mappatura dei dati di tossicità per le singole sostanze chimiche, che consentono l'identificazione di:

- 1) quali sostanze chimiche potrebbero portare a effetti combinati/AO,
- 2) dove mancano le informazioni e
- 3) ulteriori esigenze di sperimentazione mirate.

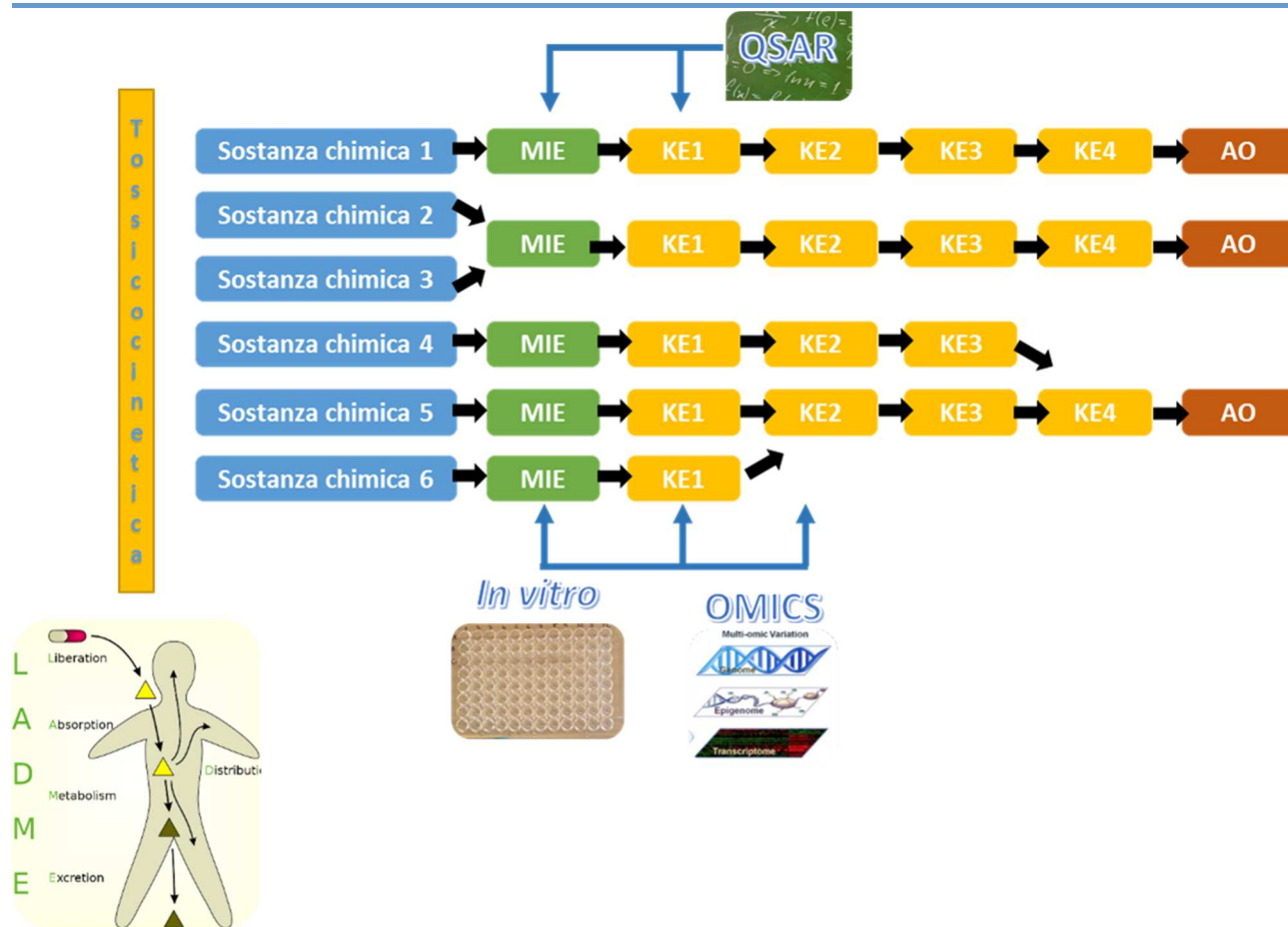


Figura 6. Mappatura di diversi tipi di informazioni sulla tossicità per le singole sostanze chimiche in una miscela di reti AOP, riportati nei diversi documenti del JRC. Questa mappatura può aiutare a identificare (1) quali sostanze chimiche potrebbero portare a effetti combinati/esiti avversi comuni, (2) dove mancano le informazioni e (3) ulteriori esigenze di sperimentazione mirate. MIE: evento di iniziazione molecolare; KE: evento chiave; AO: esito avverso.

Le reti AOP possono quindi contribuire all'integrazione dei dati provenienti da diversi tipi di test (*in vitro*, *in silico*, e *in vivo*) e in vari livelli di organizzazione biologica, e quindi capire quali lacune di dati di tossicità vadano colmate. Inoltre, gli AOP e le loro reti possono essere utilizzati per il raggruppamento di sostanze chimiche secondo il loro MoA, che è un passo importante nella valutazione delle miscele (Bopp et al., 2015).

Il JRC, nei report prodotti, fornisce degli spunti di quello che in prospettiva potranno essere ulteriori sfide nella valutazione del rischio da miscela. Ad esempio, sarebbe importante riuscire a considerare nell'analisi di rischio anche la sequenzialità di esposizione (fattore temporale). Infatti, poiché l'esposizione alle sostanze chimiche nell'ambiente è spesso episodica e ripetuta, gli organismi possono essere esposti sequenzialmente ad una serie di contaminanti. È stato dimostrato che anche la sequenza di esposizione può modificare la tossicità osservata. Ad esempio, se le sostanze chimiche agiscono sulle vie coinvolte nella cancerogenesi, potrebbero non essere singolarmente cancerogene, ma potrebbero produrre sinergie cancerogene nel corso di una vita.

Inoltre, un'altra sfida riguarda l'incertezza sulla composizione delle miscele; ad esempio, molte sostanze potrebbero essere sotto il limite di determinazione analitica (LOD). A tal proposito, viene suggerito che le

lacune sui dati sull'esposizione potranno essere gestite mediante l'uso complementare di approcci di modellazione prospettica e di monitoraggio retrospettivo. In ogni caso, una più aperta condivisione dei dati migliorerà ulteriormente l'esposizione e la valutazione dei pericoli.

A tal proposito, JRC segnala che è stata creata la piattaforma IPCHEM (<http://ipchem.jrc.ec.europa.eu/>), che riporta i dati di monitoraggio chimico per vari comparti (ambiente, alimenti e mangimi, esseri umani, prodotti di consumo e l'aria indoor) effettuata dagli organi della Commissione europea, dagli Stati membri dell'UE, dalle organizzazioni internazionali e nazionali e dagli enti di ricerca. La piattaforma supporta un approccio coordinato per la raccolta, l'archiviazione, l'accesso e il confronto dei dati relativi alla presenza di sostanze chimiche e dei loro metaboliti, in relazione all'uomo e all'ambiente. È stato anche discusso l'uso e l'ulteriore sviluppo di IPCHEM per la valutazione delle miscele chimiche e il supporto alla valutazione del rischio da miscele (Bopp et al., 2018; Dalla Costa et al., 2018).

Inoltre, è stato recentemente proposto l'Aggregate exposure pathway (AEP) per raccogliere tutte le informazioni pertinenti sul destino ambientale e sull'esposizione a sostanze chimiche e fattori di stress attraverso l'ambiente fino all'individuo o alla popolazione. È specificamente progettato per organizzare i dati di

esposizione da più fonti, consentendo che le informazioni siano prontamente disponibili e evidenziando le lacune e le incertezze dei dati. L'AEP inizia con il rilascio della o delle sostanze chimiche nell'ambiente da una fonte fino alle esposizioni del sito di destinazione (*Target Site Exposures, TSE*). L'AEP è costituito da due entità: un *Key Exposure State* che descrive la quantità di un fattore di stress in un determinato luogo e tempo, e una relazione transitoria chiave che descrive il trasporto di tale fattore di stress in un luogo diverso o la trasformazione di tale un fattore di stress in una molecola differente. I singoli AEP possono essere assemblati in reti AEP per caratterizzare lo spostamento di più sostanze chimiche e trasformazioni da una sostanza chimica a un'altra (Hines et al., 2018). Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli di tipo tossicocinetico (TK) sono riportati nella Tabella 9. La modellazione correlata al TK può supportare le estrapolazioni tra le specie e le vie di esposizione, simulando al tempo stesso la tempistica dell'esposizione/i ambientale e la corrispondenza dei tempi alla risposta di interesse.

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche secondo quanto riportato nei diversi documenti del JRC.

Esposizione				
Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>US EPA Exposure tool box</i>	L'ExpoBox dell'EPA è uno strumento creato per assistere le persone governative, dell'industria, del mondo accademico e del pubblico in generale con la valutazione dell'esposizione. Si tratta di un compendio di strumenti di valutazione dell'esposizione che si collega a documenti di orientamento, banche dati, modelli, materiali di riferimento e altre risorse correlate. EPA ExpoBox è organizzata secondo i sei set di strumenti.	Classi chimiche Pesticidi Altre sostanze organiche, inorganici e fibre Nanomateriali	utilizza l'interfaccia di ricerca avanzata per cercare oltre 700 strumenti per eseguire le valutazioni dell'esposizione. I risultati visualizzeranno un elenco di strumenti con una breve descrizione	https://www.epa.gov/expobox https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/expobox/efhToolSearch.cfm Continuamente aggiornato
<i>USEtox</i>	È un modello di consenso scientifico approvato dall' <i>UNEP/SETAC Life Cycle Initiative</i> per caratterizzare gli impatti delle sostanze chimiche sull'uomo e sugli ecosistemi. L'output principale è un database di fattori di caratterizzazione consigliato e fattori di caratterizzazione intermedi, tra cui il destino, l'esposizione e i parametri dell'effetto.	Modello di esposizione Farfield (rilasci industriali)	Stima la quantità media di sostanza chimica che entra nell'aria, nell'acqua e nel suolo; output: fattori di caratterizzazione inclusi il destino, l'esposizione e i parametri di effetto	http://www.usetox.org/ In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>ConsExpo</i> <i>ConsExpo web</i>	ConsExpo è un programma per computer che consente la stima e la valutazione dell'esposizione a sostanze provenienti da prodotti di consumo come vernici, detersivi e prodotti per la cura personale. Il modello è sviluppato dall'Istituto nazionale per la salute pubblica e l'ambiente olandese (RIVM).	Sostanze provenienti da prodotti di consumo, ad esempio vernici, detersivi, prodotti per la cura personale	Stima e valutazione dell'esposizione tramite inalazione, pelle o assunzione orale	https://www.rivm.nl/en/Topics/C/ConsExpo https://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Scientific/Reports/2016/december/ConsExpo_Web_Consumer_exposure_models_Model_documentation Attivo; diverse versioni, in continuo aggiornamento disponibile dalla pagina web del RIVM (NL)

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (1)

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>DustEx tool</i>	DustEx è un modello per valutare l'esposizione a sostanze semi-volatili da prodotti di consumo che vengono introdotti nell'ambiente indoor.	I composti organici semi-volatili (SVOC) rilasciati da prodotti di consumo di materiali solidi in aria indoor	Valutazione dell'esposizione mediante inalazione di sostanza in fase gassosa o legata a particelle aerodisperse, assorbimento cutaneo dall'aria, ingestione orale con polvere	http://www.rivm.nl/en/Topics/C/ConsExpo/Related_tools/DustEx_tool In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>MCRA tool</i>	MCRA rappresenta la valutazione del rischio Monte Carlo. MCRA è un sistema basato sul Web per l'esposizione probabilistica e la valutazione dei rischi delle sostanze chimiche nell'alimentazione. Il sistema MCRA riunisce modelli statistici, dati condivisi e dati caricati dall'utente. MCRA 8 fornisce anche la valutazione dell'esposizione cumulativa per le sostanze chimiche raggruppate in un gruppo di valutazione cumulativa per il quale è considerato pertinente un unico effetto sanitario.	Alimenti	Esposizione probabilistica e valutazione del rischio di sostanze chimiche nell'alimentazione, incluse le sostanze chimiche raggruppate in un gruppo di valutazione cumulativa per il quale è considerato pertinente un unico effetto sanitario; l'esposizione da altre vie può essere aggiunta in una valutazione dell'esposizione aggregata.	https://mcra.rivm.nl In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>Probabilistic Aggregate Consumer Exposure Model (PACEM)</i>	Sviluppato un modello di esposizione al consumatore orientato alla persona, che è stato utilizzato anche da Gosens et al. (2014) e Delmaar et al. (2014) per modellare l'esposizione aggregata dei parabeni e del Dietil Ftalato. Le sue elevate prestazioni sono state valutate rispetto ai risultati ottenuti in una valutazione convenzionale di livello inferiore. Il centro del modello è un database di questionari sui dettagli biometrici e i dati di uso di C& PCP per 516 adulti olandesi tra 18 e 74 anni (Biesterbos et al., 2013). Il database di utilizzo del prodotto contiene un elenco di C& PCPS applicato da ogni questionario intervistato su base regolare, gli importi di utilizzo e le frequenze per i prodotti specificati, così come l'ora approssimativa del giorno e la parte del corpo di applicazione del prodotto.	Ingredienti di prodotti di consumo	Per tenere conto di scenari di esposizione complessi a multivie	Gosens et al. (2014) e Delmaar et al. (2014)

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (III)

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
PROMISE©	Metodologia probabilistica per il miglioramento della valutazione dell'esposizione dei solventi (PROMISE)	Solventi		Silken Inc., (2003) Ultimato
<i>Risk Assessment Identification And Ranking (RAIDAR) model</i>	Il modello RAIDAR (Risk Assessment IDentification And Ranking) è un modello di valutazione del rischio a livello di screening che riunisce informazioni sulla ripartizione chimica, la reattività, il destino ambientale e il trasporto, il bioaccumulo, l'esposizione, l'obiettivo critico o i livelli di effetto e di emissione in un sistema coerente di valutazione del rischio.	Modello di esposizione Farfield (rilasci industriali)	Stima la quantità media di sostanza chimica che entra nell'aria, nell'acqua e nel suolo; riunisce informazioni sulla ripartizione chimica, la reattività, il destino ambientale e i trasporti, il bioaccumulo, l'esposizione, gli obiettivi critici o i livelli di effetto e le emissioni	http://www.trentu.ca/academic/aminss/envmodel/models/RAIDAR100.html In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>Stochastic Human Exposure and Dose Simulation (SHEDS) model</i>	I modelli SHEDS sono modelli probabilistici in grado di stimare le esposizioni da sostanze chimiche incontrate nelle attività quotidiane. I modelli sono in grado di generare previsioni di esposizioni aggregate e cumulative nel corso del tempo per informare le valutazioni del rischio che proteggono la salute umana. SHEDS può stimare la gamma di esposizioni chimiche totali in una popolazione di diversi percorsi di esposizione in diversi periodi di tempo, data una serie di caratteristiche demografiche. SHEDS può anche aiutare a identificare percorsi di esposizione critica, fattori e incertezze.	Modello di esposizione Nearfield (prodotti di consumo e prodotti interni)	In grado di generare previsioni di esposizioni aggregate e cumulative nel tempo; da inalazione, contatto con la pelle e ingestione alimentare e non	https://www.epa.gov/chemical-research/stochastic-human-exposure-and-dose-simulation-sheds-estimate-human-exposure In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>Exposure Analysis Modelling System (EXAMS)</i>	L' EXAMS (EPA-600/3-82-023), fornisce software interattivi per la formulazione di modelli di ecosistemi acquatici e la valutazione rapida delle concentrazioni di destino, trasporto e esposizione di sostanze organiche sintetiche sostanze chimiche – pesticidi, materiali industriali e percolato dai siti di smaltimento. EXAM contiene un sistema integrato di gestione del database (DBMS) appositamente progettato per la memorizzazione e la gestione dei database di progetto richiesti dal software. L'interazione dell'utente è fornita da un'interfaccia a riga di comando (CLI) completa, menu di aiuto sensibili al contesto, un dizionario dati on-line e una guida degli utenti CLI e funzionalità di stampa per la revisione dei dati di output. EXAM fornisce 20 tabelle di output che documentano i DataSet di input e forniscono riepiloghi dei risultati integrati per gli aiuti nelle valutazioni ecologiche dei rischi.	Contaminanti ambientali	Applicazione software interattiva per la formulazione di modelli di ecosistemi acquatici e la rapida valutazione del destino, trasporto e concentrazioni di esposizione di sostanze chimiche organiche sintetiche	https://www.epa.gov/exposure-assessment-models/exams-version-index In corso di realizzazione, costantemente aggiornato

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (IV)

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>Crema Food Safety</i>	È un servizio software in grado di quantificare l'esposizione totale aggregata da costituenti e ingredienti.	Costituenti e ingredienti alimentari (pesticidi, contaminanti, additivi, aromi, imballaggi composti migratori, contaminanti microbici, metalli pesanti, prodotti per il trattamento delle colture, ingredienti delle ricette)	Esposizione aggregata a pesticidi, contaminanti, additivi e altri componenti; Europa, Nord/Sud America, Asia	https://www.cremeglobal.com/products/creme-food-safety In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>Crema Care & Cosmetics</i>	È un software per l'analisi dei consumatori e la valutazione della sicurezza dei prodotti cosmetici e della cura personale. Per ogni consumatore, segnala quali prodotti vengono utilizzati, quando vengono utilizzati e con quale frequenza. Con questa potente informazione, esso permette di testare l'impatto dell'aggiunta di ingredienti cosmetici sui consumatori.	Prodotti per la cura personale e cosmetici (es. lozione per il corpo, igiene orale, lozioni idroalcoliche, prodotti per la doccia, cosmetici, prodotti per il trattamento dell'aria) Colori Sapori Profumi Prodotti chimici Contaminanti nanotecnologia Ingredienti funzionali Conservanti	Esposizione da inalazione, assorbimento cutaneo, ingestione: dati provenienti da Stati Uniti e Europa	https://www.cremeglobal.com/products/creme-care-cosmetics In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>Crema RIFM</i>	Il modello RIFM fornisce un dettagliato sistema di valutazione dell'esposizione sistemica e cutanea per i composti delle fragranze.	Fragranze	Sistema di valutazione dell'esposizione sistemica e dermica aggregata per i composti delle fragranze. Il modello dispone di dati per valutare l'esposizione dei consumatori in Europa e negli USA	https://www.cremeglobal.com/products/creme-rifm In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>Crema Cumulative and Aggregate Risk Evaluation System Next Generation (CARES NG)</i>	Il CARES NG è un modello probabilistico basato sui cloud che si basa su dati pubblici e utilizzato per stimare l'esposizione aggregata e cumulativa ai pesticidi	pesticidi	Software probabilistico basato sui cloud, facilita l'esposizione multi-source, multi-route (singoli prodotti chimici) e cumulativo (più sostanze chimiche)	https://www.cremeglobal.com/products/cares-ng In corso di realizzazione, costantemente aggiornato

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (V)

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>BROWSE (Bystanders, Residents, Operators and Workers Exposure models for plant protection products) model</i>	modelli attualmente utilizzati nella valutazione del rischio dei prodotti fitosanitari (PPP) per valutare l'esposizione di operatori, lavoratori, residenti e passanti	prodotti fitosanitari	calcola le esposizioni per una gamma di applicazioni di pesticidi I modelli per scenari di esposizione chiave che coprono diverse regioni dell'UE saranno sviluppati in ordine di priorità sulla base di consultazioni con le parti interessate, attuati come software di facile utilizzo e testati con gli utenti finali.	https://secure.fera.defra.gov.uk/browse/software Ultimato
<i>Agricultural Operator Exposure Model (AOEM), BfR</i>	Sei modelli convalidati per scenari tipici di miscelazione/carico dei pesticidi e applicazioni all'aperto, tra cui spruzzatura verso il basso e verso l'alto con attrezzature montate su veicoli/trainate o portatili. Come fattore importante che contribuisce all'esposizione degli operatori, è stata identificata la quantità di sostanza attiva utilizzata al giorno. Altri parametri come il tipo di formulazione, la dimensione delle gocce, la presenza di una cabina o la densità del baldacchino sono stati selezionati come fattori per particolari sotto-scenari.	per esempio, stima dei pesticidi	Stima dell'esposizione degli operatori agricoli	https://mobil.bfr.bund.de/cm/350/joint-development-of-a-new-agricultural-operator-exposure-model.pdf In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>HBM SIMULATOR</i>	È un modello software facile da usare sviluppato da CEFIC LRI in collaborazione con VITO, il Health & Safety Laboratory e il Summit Toxicology come parte del progetto HBM4. Funziona su MATLAB Component Runtime 7,14 deve essere installato.	Sostanze chimiche ambientali in casa	modello di biomonitoraggio umano per comprendere la variabilità inter- e intra-individuale nei campioni spot di biomonitoraggio umano	http://cefic-lri.org/toolbox/hbm-simulator/ Ultimato
<i>MERLIN Expo</i>	Il MERLIN-Expo contiene una serie di modelli per simulare il destino delle sostanze chimiche nei principali sistemi ambientali e nel corpo umano	Contaminanti ambientali	Stima del rilascio chimico dalla fonte al bersaglio (umano o animale) attraverso diversi mezzi di comunicazione (acqua, fiume, mare - terra, azienda agricola - aria)	https://merlin-expo.eu/ Attivo

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (VI)

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>ExpoCast Exposure Science for Prioritization and Toxicity Testing</i>	Il programma ExpoCast promuoverà una nuova ricerca sulla scienza dell'esposizione per (1) informare la prioritizzazione chimica, (2) comprendere le implicazioni della risposta del sistema alle perturbazioni chimiche a livello individuale e di popolazione, (3) collegamento informazioni sulla potenziale tossicità dei contaminanti ambientali ai risultati della salute nel mondo reale.	Contaminanti ambientali	ExpoCast caratterizza l'esposizione biologicamente rilevante a sostegno del programma di tossicologia computazionale del JRC. L'obiettivo generale di questo programma è quello di sviluppare nuovi approcci e strumenti per valutare e classificare le sostanze chimiche, sulla base del potenziale di esposizione umana biologicamente rilevante, per informare la prioritizzazione e i test di tossicità	https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryId=211811 In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>TERRACE, Terrestrial Runoff Modeling for Risk Assessment of Chemical Exposure</i>	Strumento all'avanguardia per una migliore previsione delle concentrazioni di sostanze chimiche, come i pesticidi e gli inquinanti industriali, nelle acque che entrano nei sistemi fluviali all'interno di un sistema di informazione geografica (GIS). Questo sistema fornisce gli output delle concentrazioni ambientali previste (PECs) per l'uso nella valutazione del rischio dell'esposizione chimica.	Contaminanti ambientali	TERRACE consiste di tre componenti: modelli che simulano i processi di runoff idrologico e il trasporto dei contaminanti associato; un database di parametri necessari per l'input di questi modelli (ad esempio informazioni su topografia, suoli, geologia, uso del suolo, ecc.) e software di mappatura. Questo software di mappatura agisce come un'interfaccia tra i modelli e il database e come mezzo per visualizzare i risultati del modello.	http://cefic-iri.org/toolbox/terrace/ Ultimato; il database TERRACE non è più compatibile con gli attuali sistemi operativi
<i>Estimation and Assessment of Substance Exposure (EASE)</i>	Il modello prevede l'esposizione sul luogo di lavoro per un'ampia gamma di sostanze pericolose per la salute, è in fase di sviluppo e in uso fin dai primi anni novanta. EASE è un modello basato sulla conoscenza utilizzato dai regolatori per la valutazione di sostanze nuove ed esistenti.	Prodotti chimici nuovi ed esistenti	Il modello EASE categorizza l'esposizione professionale con riferimento ai dati storici raccolti nella banca dati nazionale di esposizione (NEDB) del Regno Unito	http://www.hse.gov.uk/research/rrhtm/rr136.htm In corso di realizzazione, costantemente aggiornato
<i>OECD Pov and LRTP Screening Tool</i>	Software in formato foglio di calcolo contenente modelli di destino chimico multimediale. Uno strumento per stimare la persistenza complessiva (POV) e il potenziale di trasporto a lungo raggio (LRTP) di prodotti chimici organici a livello di screening, uno strumento per la valutazione comparativa delle proprietà di pericolo ambientale di diverse sostanze chimiche. Specificamente progettato per aiutare a identificare potenziali POP (inquinanti organici persistenti) in base alla persistenza e metriche di trasporto a lungo raggio.	sostanze chimiche organiche	Gli utenti possono scegliere prodotti chimici da un database o inserire i dati per le sostanze chimiche di interesse quali proprietà fisico-chimiche e emivita di degradazione. È possibile trasportare i database degli utenti e memorizzarli all'interno dello strumento. È anche possibile modificare le impostazioni del modello. Il risultato del calcolo del modello è mostrato in output sia numerici che grafici.	http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/oecdповandlrtpscreening-tool.htm Ultimato

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (VII)

Cinetiche

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>HTTK: High-Throughput Toxicokinetics</i>	Funzioni e tabelle di dati per la simulazione e l'analisi statistica della tossicocinetica (TK) utilizzando dati ottenuti da un throughput relativamente elevato, studi in vitro. Sia basati sulla fisiologia (PBTk) sia empirici (ad esempio, uno comparto) Un campionario Monte Carlo è incluso per simulare la variabilità biologica e le limitazioni di misura.	I modelli TK possono essere parametrizzati per diverse centinaia di sostanze chimiche e specie multiple	Immettere dati CL, proprietà fisico-chimiche e FUB della sostanza chimica. Queste funzioni e dati forniscono una serie di strumenti per l'estrapolazione in vitro in vivo (IVIVE) di dati di screening di alto throughput (ad esempio ToxCast) a esposizioni reali tramite dosimetria inversa (noto anche come RTK). Output: Curva di risposta nel tempo nel sangue, altri organi bersaglio e/o in urine.	John Wambaugh, Robert Pearce, Caroline Ring, Jimena Davis, Nisha Sipes, and R. Woodrow Setzer https://cran.r-project.org/web/packages/httk/index.html Attivo; diverse versioni disponibili diverse versioni
<i>MEGen/Rvis</i>	MEGen consente all'utente di descrivere la fisiologia, la biologia e la tossicologia al fine di produrre una serie di equazioni matematiche che simulano le informazioni fornite dall'utente e costituiscono un modello PBK.	Qualsiasi sostanza chimica per la quale sono disponibili dati per parametrizzare il modello	Sono necessari diversi parametri di input per descrivere il destino della sostanza chimica e la biochimica e la fisiologia umana/animale. Output: Curva di risposta del tempo nel sangue, altri organi bersaglio e/o in urine.	http://cefic-iri.org/toolbox/pbpmegen/ http://xnet.hsl.gov.uk/megen/ Ultimato
<i>Plethem</i>	Piattaforma disponibile per la modellazione rapida tra fonti e risultati utilizzando solo dati in silico e in vitro. – Un modello generico a diffusione limitata a 1.1 compartimenti PBPK	Ampia libreria di prodotti chimici e capacità di importare nuove sostanze chimiche, di farmaci Prodotti chimici ambientali	Modello IVIVE ad alta capacità di trasmissione per estrapolare il punto di partenza misurato in vitro a esposizioni equivalenti. Modello di estrapolazione dai dati in vitro a quelli in vivo per l'estrapolazione dei valori di metabolismo misurati in vitro ai valori in vivo previsti.	http://www.scitovation.com/plethem.html In corso di realizzazione, costantemente aggiornato da Scitovation
<i>PK-Sim e MoBi dell'Open Systems Pharmacology Suite</i>	La suite Open System Pharmacology contiene diversi strumenti software e per consentire un'efficiente modellazione e simulazione su più scale. Mentre PK-SIM® si basa su un concetto del corpo come un tutt'uno, il focus del MoBi®, è a livello molecolare. Tuttavia, entrambi gli strumenti si estendono a ulteriori scale fisiologiche	farmaci	Concetto di blocco di costruzione: in PK-SIM, "individuo/popolazione", "composto", "protocollo di amministrazione", "formulazione", e "evento" sono impostati come unità separate e riutilizzabili. Per creare una simulazione, i blocchi predefiniti sono semplicemente combinati. In MoBi, questi blocchi predefiniti sono definiti in un modo più utilizzabile per i modellatori: "struttura spaziale", "molecole", "reazioni", "osservatori", "eventi", "valori di avvio" e "trasporto passivo".	http://www.systems-biology.com/products/pk-sim/ Disponibile on line

Tabella 9. Esempi di modelli di esposizione disponibili pertinenti e modelli/piattaforme tossicocinetiche (VIII)

Nome/strumento	Descrizione	Limitato a prodotti chimici specifici	Tipo di dati	Riferimento/Links & stato
<i>Review sui modelli PBK per le miscele</i>	Un articolo internazionale <i>peer reviewed</i> su tutti i modelli PBK sviluppati fino al 15 dicembre 2016. In esso sono compresi 22 modelli per le miscele binarie, 5 per le miscele ternarie, 3 per le miscele quaternarie e 5 per le miscele complesse.	Droghe Miscele di composti chimici ambientali		Desalegn et al., 2019, Role of Physiologically Based Kinetic modelling in addressing environmental chemical mixtures – A review. Computational Toxicology. https://doi.org/10.1016/j.comtox.2018.09.001 Ultimato
<i>SimCyp</i>	Esso collega i dati in vitro ai dati ADME in vivo (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione) e i risultati farmacocinetici/farmacodinamici (PK/PD) per aiutare a esplorare le potenziali complessità cliniche prima degli studi umani e sostenere il processo decisionale nei farmaci sviluppo.	Farmaci	aiuta nella selezione della dose e informare l'etichettatura dei prodotti	https://www.certara.com/software/pbpbk-modeling-and-simulation/?ap%5B0%5D=PBPK Disponibile con licenza
<i>Gastroplus PBPKPlus ADMET predictor</i>	GastroPlus è un pacchetto software di basato su simulazione meccanicistica che simula endovena, orale, cavità orale, oculare, inalazione, dermica/sottocutaneo, e l'assorbimento intramuscolare, farmacocinetica, e farmacodinamica in esseri umani e animali	Farmaci	Integra i dati raccolti e, nel contesto di un modello animale o umano virtuale Adulti e in pediatria	https://www.simulations-plus.com/software/gastroplus/ Disponibile con licenza

Riferimenti bibliografici

- Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311>
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741. <https://doi.org/10.1002/etc.34>
- ATSDR, 2018. Framework for Assessing Health Impacts of Multiple Chemicals and Other Stressors. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- ATSDR, 2005. Public Health Guidance Manual (Update). US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR, 2004. Guidance Manual for the Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures. US Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Baas, J., Jager, T., Kooijman, B., 2010. A review of DEB theory in assessing toxic effects of mixtures. *Sci. Total Environ.* 408, 3740–3745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.037>
- Bopp, S., Berggren, E., Kienzler, A., van der Linden, S., Worth, A., 2015. Scientific methodologies for the assessment of combined effects of chemicals – a survey and literature review. JRC Technical Report. EUR 27471 EN, 64 pp. Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2788/093511>
- Bopp, S., Kienzler, A., Richarz, A., van der Linden, S., Paini, A., Parisi, N., Worth, A., 2019. Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward. *Crit. Rev. Toxicol.* 49, 174–189. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1579169>
- Bopp, S.K., Barouki, R., Brack, W., Dalla Costa, S., Dorne, J.-L.C.M., Drakvik, P.E., Faust, M., Karjalainen, T.K., Kefalopoulos, S., van Klaveren, J., Kolossa-Gehring, M., Kortenkamp, A., Lebret, E., Lettieri, T., Nørager, S., Rügge, J., Tarazona, J. V., Trier, X., van de Water, B., van Gils, J., Bergman, Å., 2018. Current EU research activities on combined exposure to multiple chemicals. *Environ. Int.* 120, 544–562. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.037>
- CCME, 2010. Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Carcinogenic and Other PAHs, in: Canadian Environmental Quality Guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. (Canadian Council of Ministers of the Environment).
- CCME, 2002a. Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Dioxins and Furans, in: Canadian Environmental Quality Guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. Canadian Council of Ministers of the Environment.
- CCME, 2002b. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Nonylphenol and its ethoxylates, in: Canadian Environmental Quality Guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. Canadian Council of Ministers of the Environment.
- CEARO, 1994. A reference guide for the Canadian Environmental Assessment Act. Addressing cumulative environmental effects.
- CEFIC, 2018. Position Paper on Combination Effects of Chemicals.
- CEFIC, 2010. REACH Practical Guide on Exposure Assessment and Communication in the Supply Chains. European Chemical Industry Council.
- Dalla Costa, S., Kefalopoulos, S., Bopp, S., Kienzler, A., Richarz, A., van der Linden, A., Korytar, P., Bachhaus, T., Lebret, E., van Klaveren, J., van der Voet, H., 2018. JRC workshop on IPCHEM supporting the assessment of chemical mixtures. Final report. JRC workshop report, Joint Research Centre, Ispra, Italy. JRC112027.
- De Brouwere, K., Cornelis, C., Arvanitis, A., Brown, T., Crump, D., Harrison, P., Jantunen, M., Price, P., Torfs, R., 2014. Application of the maximum cumulative ratio (MCR) as a screening tool for the evaluation of mixtures in residential indoor air. *Sci. Total Environ.* 479–480, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.083>
- Dyer, S.D., White-Hull, C.E., Shephard, B.K., 2000. Assessments of Chemical Mixtures via Toxicity Reference Values Overpredict Hazard to Ohio Fish Communities. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2518–2524. <https://doi.org/10.1021/es991160h>
- EC, 2012. COM(2012) 252 final, COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL The combination effects of chemicals, Chemical mixtures. European Commission.
- EC, 2009a. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- EC, 2009b. State of the art report on mixture toxicity—final report (Study Contract No 070307/2007/485103/ETU/D.1). Directorate General Environment, European Commission.
- EC, 2005. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in

- or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- ECETOC, 2016. TECHNICAL REPORT NO.126 – GUIDANCE FOR EFFECTIVE USE OF HUMAN EXPOSURE DATA IN RISK ASSESSMENT OF CHEMICALS.
- ECETOC, 2012. Effects of Chemical Co-exposures at Doses Relevant for Human Safety Assessments. Technical Report 115. ECETOC, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.
- ECETOC, 2011. Development of guidance for assessing the impact of mixtures of chemicals in the aquatic environment. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.
- ECHA, 2017a. Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume III Human Health - Assessment & Evaluation.
- ECHA, 2017b. Identification and naming of substances under REACH and CLP.
- ECHA, 2014. Transitional guidance on the biocidal products regulation. Transitional guidance on mixture toxicity assessment for biocidal products for the environment.
- ECHA, 2013. Guidance on information requirements-GUIDANCE ON REGULATION (EU) No 528/2012 CONCERNING THE MAKING AVAILABLE ON THE MARKET AND USE OF BIOCIDAL PRODUCTS (BPR).
- ECHA, 2012. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter 19-Uncertainty analysis.
- ECHA, 2011. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Part B- Hazard Assessment, December 2011.
- EFSA, 2019. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. EFSA (European Food Safety Authority). EFSA J. 17, 5634. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5634>
- EFSA, 2018. Draft guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. EFSA (European Food Safety Authority).
- EFSA, 2014. Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. EFSA (European Food Safety Authority). EFSA J. 12, 3594. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3594>
- EFSA, 2013. International Frameworks Dealing with Human Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals. EFA (European Food Safety Authority). EFSA J. 11, 3313.
- EFSA, 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. EFSA (European Food Safety Authority). EFSA J. 6, 724. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.724>
- EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Parliament related to the safety assessment of wild and farmed fish. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 3, 236. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.236>
- EFSA CONTAM Panel, 2017. Statement on the risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 15, 4908. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4908>
- EFSA CONTAM Panel, 2012. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 10, 2798. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2798>
- EFSA CONTAM Panel, 2011. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 9, 2406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2406>
- EFSA CONTAM Panel, 2009. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 7, 1393. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1393>
- EFSA FEEDAP, 2017. Scientific Opinion on the safety and efficacy of an essential oil from *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) letsw. var. *Vulkan* when used as a sensory additive in feed for all animal species. EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Additives and P. EFSA J. 15, 5095. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5095>
- EFSA PPR Panel, 2013a. Scientific Opinion on the identification of pesticides to be included in cumulative assessment groups on the basis of their toxicological profile. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Plant Protection Products and their Residues. EFSA J. 11, 3293. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3293>
- EFSA PPR Panel, 2013b. Guidance on tiered risk assessment for Plant Protection Products for aquatic organisms in edge-of-field Health Canada (2017), Cumulative Risk Assessment Framework. Regulatory Proposal PRO2017-01. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. EFSA J. 11, 3290.
- EFSA PPR Panel, 2012a. Scientific opinion on the science behind the development of a risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA (European Food Safety Authority). EFSA J. 10, 2668.
- EFSA PPR Panel, 2012b. Guidance on the Use of Probabilistic Methodology for Modelling Dietary Exposure to Pesticide Residues. EFSA J. 10, 2839.

- <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2839>
- EFSA PPR Panel, 2008. Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to h. EFSA J. 704, 1–84. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.705>
- Escher, B.I., Ashauer, R., Dyer, S., Hermens, J.L., Lee, J.-H., Leslie, H.A., Mayer, P., Meador, J.P., Warne, M.S., 2011. Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 28–49. <https://doi.org/10.1002/ieam.100>
- EU, 2015. REGOLAMENTO (UE) 2018/2005 DELLA COMMISSIONE del 17 dicembre 2018 che modifica l'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle s.
- EU, 2011. Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards.
- Gehring, R., van der Merwe, D., 2014. Toxicokinetic-toxicodynamic modeling, in: *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier, pp. 149–153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00008-7>
- Han, X., Price, P.S., 2013. Applying the maximum cumulative ratio methodology to biomonitoring data on dioxin-like compounds in the general public and two occupationally exposed populations. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 23, 343–349. <https://doi.org/10.1038/jes.2012.74>
- Han, X., Price, P.S., 2011. Determining the Maximum Cumulative Ratios for Mixtures Observed in Ground Water Wells Used as Drinking Water Supplies in the United States. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 4729–4745. <https://doi.org/10.3390/ijerph8124729>
- Hines, D.E., Edwards, S.W., Conolly, R.B., Jarabek, A.M., 2018. A Case Study Application of the Aggregate Exposure Pathway (AEP) and Adverse Outcome Pathway (AOP) Frameworks to Facilitate the Integration of Human Health and Ecological End Points for Cumulative Risk Assessment (CRA). *Environ. Sci. Technol.* 52, 839–849. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04940>
- Isaacs, K.K., Goldsmith, M.-R., Egeghy, P., Phillips, K., Brooks, R., Hong, T., Wambaugh, J.F., 2016. Characterization and prediction of chemical functions and weight fractions in consumer products. *Toxicol. Reports* 3, 723–732. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.08.011>
- ISPRA, 2013. Rapporto nazionale pesticidi nelle acque: dati 2009-2010. Edizione 2013. ISPRA Rapporti 175/2013.
- Jager, T., Vandenbrouck, T., Baas, J., De Coen, W.M., Kooijman, S.A.L.M., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology* 19, 351–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0417-z>
- JRC, 2017. Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. Joint Research Centre. Joint Research Centre. <https://doi.org/10.2788/138523>
- JRC, 2016. Review of case studies on the human and environmental risk assessment of chemical mixtures. Joint Research Centre.
- JRC, 2015. Scientific methodologies for the assessment of combined effects of chemicals: a survey and literature review. Joint Research Centre, Publications Office of the European Union.
- JRC, 2014. Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. Joint Research Centre. <https://doi.org/10.2788/138523>
- Kienzler, A., Bopp, S., van der Linden, S., Berggren, E., Worth, A., 2016. Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 80, 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.020>
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
- NRC, 2008. Phthalates and Cumulative Risk Assessment: The Task Ahead. National Research Council. Washington, DC.
- OECD, 2018. Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals, Series on Testing and Assessment No. 296, Environment, Health and Safety Division, Environment Directorate. OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development.
- OECD, 2014. Guidance on Grouping of Chemicals. OECD Environment Directorate, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing & Assessment No. 194., Second Edi. ed.
- OECD, 2013. Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. Series on testing and assessment no. 184. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Price, P., Dhein, E., Hamer, M., Han, X., Heneweer, M., Junghans, M., Kunz, P., Magyar, C., Penning, H., Rodriguez, C., 2012a. A decision tree for assessing effects from exposures to multiple substances. *Environ. Sci. Eur.* 24, 26. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-26>
- Price, P., Han, X., Junghans, M., Kunz, P., Watts, C., Leverett, D., 2012b. An application of a decision tree for assessing effects from exposures to multiple substances to the assessment of human and ecological effects from combined exposures to chemicals observed in surface waters and waste

- water effluents. *Environ. Sci. Eur.* 24, 34. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-34>
- Price, P.S., Han, X., 2011. Maximum Cumulative Ratio (MCR) as a Tool for Assessing the Value of Performing a Cumulative Risk Assessment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2212–2225. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062212>
- Reyes, J.M., Price, P.S., 2018. An analysis of cumulative risks based on biomonitoring data for six phthalates using the Maximum Cumulative Ratio. *Environ. Int.* 112, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.008>
- Sarigiannis, D.A., Hansen, U., 2012. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals – A challenge for policy makers. *Environ. Heal.* 11, S18. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-S1-S18>
- SCHER SCENIHR SCCS, 2012. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Scientific Committee on Health and Environmental Risks SCHER Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR Scientific Committee on Consumer Safety SCCS. <https://doi.org/10.2772/21444>
- Tønning, K., Jacobsen, E., Pedersen, E., Strange, M., Poulsen Brunn, P., Møller, L., Buchardt Helle, H., 2009. Survey and Health Assessment of the exposure of 2 year-olds to chemical substances in Consumer Products. Survey of Chemical Substances in Consumer Products, No. 102 2009. Danish Environmental Protection Agency.
- U.S. EPA, 2011. National Air Toxics Assessment. Glossary of Terms. United States Environmental Protection Agency.
- US-EPA, 2002. Guidance on Cumulative Risk Assessment of Pesticides Chemicals That Have a Common Mechanism of Toxicity.
- US-EPA, 2000. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. Risk Assessment Forum EPA/630/R00/002.
- US-EPA, 1986. Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures.
- US EPA, 2007. Concepts, Methods, and Data Sources For Cumulative Health Risk Assessment of Multiple Chemicals, Exposures and Effects: A Resource Document (Final Report, 2008). .S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-06/013F.
- Vallotton, N., Price, P.S., 2016. Use of the Maximum Cumulative Ratio As an Approach for Prioritizing Aquatic Coexposure to Plant Protection Products: A Case Study of a Large Surface Water Monitoring Database. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5286–5293. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06267>
- WWF, 2003. WWF-UK National Biomonitoring Survey 2003.

Lista delle abbreviazioni e dei termini comuni utilizzati

AA (*Annual average*): Media annuale

ADI (*Acceptable Daily Intake*): stima della quantità di una sostanza presente nel cibo o nell'acqua potabile che può essere consumata per tutta la vita senza presentare un rischio apprezzabile per la salute. Di solito è espresso in milligrammi della sostanza per chilogrammo di peso corporeo e si applica a sostanze chimiche come additivi alimentari, residui di pesticidi e farmaci veterinari.

ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*): Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione. Gli studi ADME sono effettuati per indagare come una sostanza chimica viene elaborata da un organismo vivente. I test tossicologici che fanno spesso parte di questo processo, hanno l'acronimo ADMET

AF (*Assessment/adjustment factor*): Fattore di sicurezza è un aggiustamento numerico usato per estrapolare da relazioni sperimentalmente determinate (es. dose-risposta) il livello di esposizione dell'agente al di sotto della quale non è probabile che si verifichi un effetto avverso.

Aggregate exposure (*Exposure to a single substance originating from different sources*): Esposizione Aggregata, la somma totale di tutta l'esposizione a uno specifico agente biologico, chimico o fisico attraverso percorsi e fonti pertinenti.

AL (*Acceptable Level*): standard di accettabilità, indica il livello massimo accettabile in genere riferito ad un rischio

AO (*Adverse Outcome*): Un cambiamento negativo nella salute, nella crescita, nel comportamento o nello sviluppo di un organismo che compromette la sua capacità di svilupparsi o sopravvivere

AOP (*Adverse Outcome Pathway*): sequenza di eventi, dall'esposizione di un individuo a una sostanza chimica fino alla comprensione dell'effetto negativo a livello individuale (per la salute dell'uomo) o livello di popolazione (per l'ecotossicologia). Gli AOP si sviluppano a più livelli di organizzazione biologica, ma includono sempre una prima interazione molecolare tra un composto e l'organismo che innesca effetti successivi a livelli più elevati di organizzazione biologica. Questa interazione è l'evento di avvio molecolare (*MIE, molecular initiating event*)

ARfD (*Acute Reference Dose*): stima della quantità di una sostanza presente nel cibo o nell'acqua potabile, espressa in base al peso corporeo, che può essere ingerita in un breve periodo di tempo, di solito durante un pasto o un giorno, senza un rischio sanitario apprezzabile per il consumatore sulla base di tutti i fatti noti al momento della valutazione

a.s. (*active substance*): principio attivo o sostanza attiva

ATE (*Acute toxicity Estimate*): Stima della tossicità acuta, viene utilizzata per determinare e calcolare le categorie di pericolo e le classi di pericolo di tossicità acuta secondo GHS / CLP.

Assessment group (encompassing cumulative assessment group) Gruppo di valutazione (che comprende il gruppo di valutazione cumulativo); i componenti della miscela vengono trattati come un unico gruppo applicando un principio comune di valutazione della miscela (ad esempio l'additività di dose) perché questi componenti hanno caratteristiche comuni (cioè i criteri di raggruppamento)

ATSDR (*Agency for Toxicity Substances and Disease Registry*): Agenzia governativa americana per le sostanze tossiche e registro delle malattie; ha sede ad Atlanta, Georgia, è un'agenzia federale di sanità pubblica del U.S. Department of Health and Human Services

BAT (*Best available Techniques*): Migliori Tecniche attualmente disponibili

BDF (*Bioassay Directed Fractionation*): Il test di frazionamento guidato; è una procedura in cui l'estratto viene cromatograficamente frazionato e rifrazionato fino a quando un composto biologicamente attivo puro viene isolato. Ogni frazione prodotta durante il processo di frazionamento viene valutata in un sistema di saggio biologico e solo le frazioni attive sono prese in considerazione.

BCF (*Bioconcentration Factor*): Fattore di Bioconcentrazione; è un indicatore della tendenza di una sostanza chimica ad accumularsi nell'organismo vivente. Può essere ottenuto con metodo di calcolo basato su logPow o test di bio-accumulo. I valori BCF calcolati sono senza unità di misura e generalmente vanno da uno a un milione.

BMD (*Benchmark Dose*): dose di riferimento. Nella valutazione del rischio delle sostanze chimiche, sia il livello di effetto avverso non osservato (NOAEL) che la dose statistica di riferimento (BMD) possono essere utilizzati come punto di partenza (POD) per ricavare un valore guida per la salute umana come la dose di riferimento (RfD) o il livello di non effetto derivato (DNEL) o l'assunzione giornaliera accettabile (ADI). Una dose di riferimento (BMD) è una dose o concentrazione che produca una variazione predeterminata del tasso di risposta di un effetto avverso. Questo cambiamento di risposta predeterminato è chiamato risposta di benchmark (BMR, benchmark response).

BMDL o BMDL10 (*Benchmark Dose Lower Confidence Limit*): è il valore corrispondente al limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95% della *Benchmark Dose*, definita come la dose in grado di causare il 10% dell'effetto critico. In altre parole, è l'esposizione che corrisponde ad una determinata variazione nella risposta (di un indicatore) rispetto al *background* o dose che corrisponde ad uno specifico livello di incremento della risposta. Il più basso livello di confidenza del 95% legato alla BMD è stato suggerito per rimpiazzare il NOAEL. Può essere considerata come una dose alla quale l'effetto è inferiore al BMR (*Benchmark Response*). <https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/170124>

- BMR (Benchmark Response)** risposta di riferimento (vedi BMD).
- CA (Concentration Addition):** Gli effetti dell'esposizione a una miscela di composti con una modalità di azione simile sono considerati la somma degli effetti corretti per la forza di ogni componente. Modello basato su componenti (*component-based*) in cui i componenti vengono trattati come se avesse un'azione simile. I componenti possono variare in potenza tossica. I componenti contribuiscono all'effetto miscela rispetto al rapporto tra la loro concentrazione e potenza tossica. La concentrazione è la metrica di esposizione utilizzata come proxy per la dose negli studi *in vitro* e nella valutazione del rischio ecologico
- CAG (Cumulative Assessment Group):** Sostanze considerate come gruppo in quanto possono agire sugli organismi secondo lo stesso meccanismo d'azione.
- CAS (Chemical Abstracts Service):** E' un'organizzazione sotto l'American Chemical Society. È una fonte di informazioni sulle sostanze chimiche; Il CAS number è un identificativo numerico che individua in maniera univoca una sostanza chimica
- CBA (Component Based Approach):** approccio basato sull'effetto dei singoli componenti di una miscela. Approccio in cui il rischio di esposizione combinata a più sostanze chimiche viene valutato sulla base dei dati sull'esposizione e sull'effetto dei singoli componenti
- CEAA (Canadian Environmental Assessment Act):** Il CEAA rappresenta la base legislativa per la valutazione ambientale nella maggior parte delle regioni del Canada.
- CEFIC (European Chemical Industry Council):** Consiglio Europeo delle Industrie Chimiche
- CEFIC MIAT (European Chemical Industry Council Mixtures Industry Ad-hoc Team):** Team del Consiglio Europeo delle Industrie Chimiche per lo studio delle miscele
- CERCLA (Comprehensive Environmental Response Compensation and Liability Act):** Il CERCLA è un fondo federale (USA) utilizzabile per risanare i siti di rifiuti pericolosi non controllati o abbandonati così come per far fronte ad emergenze dovute ad incidenti, sversamenti e altri rilasci di contaminanti nell'ambiente.
- CLP (Classification, labelling and packaging):** Classificazione, Etichettatura e Imballaggio
- CMG (Common Mechanism Group):** Gruppo di sostanze che presentano un meccanismo d'azione simile
- CMR (Carcinogenic, Mutagenic and Reprotoxic):** Sostanze cancerogene, mutagene e tossiche per la riproduzione
- Complex mixture:** Una miscela (ad esempio estratti, idrolizzati proteici, aromatizzanti) in cui non tutti i costituenti sono noti o completamente caratterizzati.
- Concentration addition:** Additività di concentrazione. Modello basato su componenti, trattati come se avessero un'azione simile. I componenti possono variare come potenza tossica. I componenti contribuiscono all'effetto combinato rispetto al rapporto tra la loro concentrazione e potenza tossica.
- CRA (Cumulative Risk assessment):** Un metodo per valutare i rischi per la salute umana o per l'ambiente derivanti da miscele di prodotti chimici.
- CSA (Chemical Safety Assessment):** Valutazione della sicurezza chimica
- DA (Dose Addition):** In genere si riferisce ad un modello di previsione della tossicità delle miscele di sostanze che presentano lo stesso meccanismo d'azione. In questo caso è possibile sommare le rispettive dosi (*dose addition*) o concentrazioni (*concentration addition*) delle sostanze presenti in miscela previa trasformazione in Unità di Tossicità (o frazioni di Unità di Tossicità)
- DE (Daily exposure):** Esposizione giornaliera
- DEB (Dynamic Energy Budget (model)):** Un modello di bilancio dinamico dell'energia (DEB) di un organismo descrive le velocità con cui esso assimila e utilizza l'energia per il mantenimento, la crescita e la riproduzione, in funzione dello stato dell'organismo e del suo ambiente
- DEHP (diethylhexyl phthalate):** di-2-etilesilftalato (DEHP, DOP), o diottilftalato, o diisooftalato, è l'estere dell'acido ftalico e del 2-etilesanolo.
- DI (Daily Intake):** Assunzione giornaliera
- DLC (Dioxin-like compound):** Composto diossino-simile
- DNEL (Derived No Effect Level):** Livello derivato di non effetto (rischio cronico, subcronico, o acuto), livello di esposizione al di sotto del quale si assume che gli effetti avversi abbiano una probabilità tendente a zero di manifestarsi nelle popolazioni esposte. Si definisce per le sostanze che agiscono con un meccanismo a soglia a partire dal NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) ed applicando dei fattori di sicurezza (AF)
- Dose addition** Modello basato sull'additività di concentrazione. La dose è la metrica di esposizione utilizzata nella valutazione del rischio per la salute umana e animale e per alcune specie ecologiche. Tutti i componenti di una miscela si comportano come se fossero diluizioni l'uno dell'altro
- DTA (Direct Toxicity Assessment):** Valutazione diretta della tossicità; è un processo per misurare il rischio ambientale (tossicità) e il rischio di danno ambientale di un effluente industriale scaricato nell'ambiente acquatico. Il DTA determina l'effetto tossico complessivo di tutti i contaminanti in un campione di effluente utilizzando una serie di test acquatici standardizzati.
- EC (Effect Concentration):** Concentrazione di effetto
- EC₅₀ (Concentration where 50 % effect was obser-**

ved/calculated): concentrazione efficace mediana: la concentrazione in grado di produrre, per un determinato tempo di trattamento, un'incidenza pari al 50% dell'effetto scelto come misura della tossicità (se l'effetto è la mortalità si ha $EC_{50}=LC_{50}$).

EC (*European Commission*): Commissione Europea

ECETOC (*European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*): Centro Europeo di ecotossicologia e tossicologia delle sostanze chimiche: associazione scientifica, senza scopo di lucro, non commerciale e non governativa

ECHA (*European Chemicals Agency*): Agenzia Europea per le sostanze chimiche

ED (*Effective Dose*): Dose Efficace, dose di una sostanza chimica che produce una risposta biologica.

EDA (*Effect Directed Analysis*): Analisi Diretta di Effetto, utilizzata per identificare e quantificare quei composti (in un campione ambientale o in miscela tecnica) che causano una risposta biologica.

EDC (*Endocrine Disrupting Compound*): Interferente Endocrino

EFSA (*European Food Safety Authority*): Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare

EIA (*Environmental Impact Assessment*): Valutazione di Impatto Ambientale

ELV (*Emission Limit Value*): Valore Limite di Emissione

EMA (*European Medicines Agency*): Agenzia Europea del Farmaco

ERA (*Ecological Risk Assessment/Environmental Risk Assessment*): Valutazione del Rischio Ecologico/Valutazione del Rischio Ambientale

EQS (*Environmental Quality Standard*): Standard di qualità ambientale

ESTAF EURL ECVAM Stakeholder Forum (*EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing*): ESTAF è un forum per le parti interessate che esprimono un'opinione rilevante per la missione in corso di EURL ECVAM (EURL: Laboratori di Riferimento dell'Unione Europea; ECVAM: Centro europeo per la convalida di metodi alternativi)

EU (*European Union*): Unione Europea

FQPA (*Food Quality Protection Act*): Atto USA del 1996 per garantire che i livelli di residui di pesticidi negli alimenti soddisfino standard rigorosi per la protezione della salute pubblica.

EURL ECVAM (*European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing*): EURL, Laboratori di Riferimento dell'Unione Europea; ECVAM, Centro europeo per la convalida di metodi alternativi

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nation*): Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura

FDA (*Food and Drugs Administration*): ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici.

FEARO (*Canadian Federal Environmental Assessment Review Office*): Agenzia Canadese per la Protezione

nell'Ambiente

FOCUS (*Forum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use*): Forum per lo sviluppo di scenari ambientali e di modelli per la previsione del destino ambientale utilizzati per la registrazione di prodotti fitosanitari in ambito UE

GHS (*Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals*): Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche che è costituito da una serie di raccomandazioni internazionali, la cui applicazione è facoltativa; l'UE ha voluto rendere obbligatorie tali raccomandazioni integrandole nel diritto comunitario; dal 2009 i criteri del sistema GHS sono quindi inclusi nella normativa che disciplina i trasporti nell'Unione Europea

GM (*Genetically Modified*): Modificato geneticamente

GMO (*Genetically Modified Organism*): Organismo modificato geneticamente

HBM (*Human Biomonitoring*): Biomonitoraggio umano: per valutare se e in che misura sostanze chimiche sono presenti nel corpo umano e in che modo l'esposizione può cambiare nel tempo. Misurando la concentrazione di composti naturali e sintetici nei fluidi corporei (sangue, urine e latte materno) o nei tessuti (capelli, unghie, grasso e ossa), il biomonitoraggio può fornire preziose informazioni sulle esposizioni ambientali e, in alcuni casi, aiutare ad identificare i potenziali rischi per la salute.

HEG (*Homogeneous Exposure Group*): Gruppo omogeneo di individui esposti agli stessi livelli di rischio

HH (*Human Health*): Salute Umana

HI (*Hazard Index*): Somma dei quozienti di pericolo, cioè rapporto tra esposizione e valore di riferimento per l'effetto tossico comune di ciascun componente in una miscela o in un CAG

HIint (*Hazard Index considering Interactions*): Indice per la valutazione della tossicità di miscele che considera anche potenziali interazione (sinergismo/antagonismo) tra i suoi componenti

HRA (*Human Health Risk Assessment*): Valutazione del Rischio per la Salute Umana

HPV (*High Production Volume*): Riferito a sostanze chimiche fabbricate o importate in grandi quantità (>1000 tonnellate all'anno)

HQ (*Hazard Quotient-Hazard Coefficient*): Rapporto tra l'esposizione potenziale a una sostanza e il livello al quale non si prevedono effetti negativi.

HTS (*High Throughput Screening*): Analisi di screening: per la produzione di nuovi farmaci o sostanze attive si vaglia un grande numero di molecole che possano interagire con il meccanismo biologico su cui si sta lavorando.

IA (*Independent Action*): Indipendenza di azione: per la valutazione degli effetti di miscela. Si ha quando le sostanze presenti in miscela presentano meccanismi di azione diversi e l'azione di un componente non influenza quella degli altri.

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*): approcci integrati per la sperimentazione e

la valutazione: IATA sono approcci flessibili per la valutazione della sicurezza chimica basati sull'integrazione e la traduzione dei dati derivati da più metodi e fonti.

Intentional mixtures (*manufactured products or formulations, including commercial mixtures of industrial substances*): Prodotti o formulati commerciali che includono più sostanze

Interaction: interazione. Nella valutazione del rischio, il termine interazione è usato per riferirsi a effetti di miscela che differiscono da un modello nullo esplicito, cioè aggiunta di dose e / o risposta. Le interazioni sono classificate come inferiori all'additivo (antagonismo, inibizione, mascheramento) o superiori all'additivo (sinergismo, potenziamento)

IC (*Index Chemical*): indice chimico

IPCS (*International Programme on Chemical Safety*): Il programma internazionale sulla sicurezza chimica (IPCS) nasce da una collaborazione tra tre organismi delle Nazioni Unite, l'Organizzazione mondiale della sanità, l'Organizzazione internazionale del lavoro e il Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente, per stabilire una base scientifica per l'uso sicuro delle sostanze chimiche e rafforzare le capacità e le capacità nazionali per la sicurezza chimica

IPPC (*Integrated Pollution Prevention and Control*): L'IPPC è la strategia europea di prevenzione e riduzione integrate dell'inquinamento che mira alla diminuzione del livello delle emissioni per conseguire un livello elevato di protezione dell'ambiente e per migliorare le prestazioni ambientali dei complessi industriali soggetti ad autorizzazione ambientale. L'IPPC è stato previsto dalla Direttiva 96/61/CE ed è stato recepito nel nostro ordinamento con il D. Lgs. 372/1999.

IRA (*Integrated Risk Assessment*): Approccio integrato di valutazione del rischio per l'uomo e per l'ambiente

JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*): Panel di esperti interni all'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) e alla FAO

KE (*Key Event*): Un cambiamento misurabile nello stato biologico che è essenziale, ma non necessariamente sufficiente, per la progressione da una definita perturbazione biologica verso un esito avverso specifico. I KE sono rappresentati come nodi in un diagramma o rete AOP (Adverse Outcome Pathway) e forniscono la verificabilità di una descrizione AOP.

KER (*Key Event Relationship*): Una relazione scientificamente fondata tra una coppia di KE, identificandone una a monte (upstream) e l'altra a valle (downstream). Facilita l'inferenza o l'estrapolazione dello stato del KE a valle a partire dallo stato, misurato o previsto, del KE a monte.

Kow (*Octanol-water Partition Coefficient*): Coefficiente di ripartizione tra le due sostanze immiscibili n-ottanolo/acqua; KOW = concentrazione in ottanolo/concentrazione in acqua. Questo coefficiente adimensionale viene utilizzato come indice della

tendenza di un composto organico ad accumularsi nei tessuti grassi degli organismi viventi e quindi a ripartirsi tra una fase acquosa e una fase organica. Per elevati valori di KOW si ha una maggiore tendenza del composto in esame a ripartirsi nelle fasi organiche e ad entrare nella catena alimentare.

logKow (*log of the Octanol-water Partition Coefficient*): Logaritmo del coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua

LC₅₀ (*Concentration of a compound that causes 50% lethality- Lethal Concentration 50*): Concentrazione letale mediana: la concentrazione di una sostanza in aria o acqua, in grado di uccidere il 50% degli animali sottoposti al saggio.

LD₅₀ (*Dose of a compound that causes 50% lethality*): Dose Letale mediana 50, si riferisce alla dose di una sostanza, somministrata in una volta sola (si distingue per tipologia, cioè per via orale, per iniezione, ecc.), in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione di cavie

LO(A)EL (*Lowest Observable (Adverse) Effect Level - Low Observed effect Concentration*): La più bassa concentrazione o quantità di una sostanza trovata per esperimento o osservazione che provoca un'alterazione avversa della morfologia, della funzione, della capacità, della crescita, dello sviluppo o della durata di vita di un organismo bersaglio distinto dai normali organismi della stessa specie in determinate condizioni di esposizione

LOD (*Limit Of Detection*): Limite di rilevabilità analitica

Margin of Exposure Rapporto tra a) un punto di riferimento (*reference point*) di (eco)tossicità e b) la dose o la concentrazione di esposizione teorica, prevista o stimata

MAF (*Mixture Assessment Factor*): Fattore di Sicurezza per miscele; a volte definito "MUF", (*Mixture Uncertainty Factor*) è analogo all'AF utilizzato per singole sostanze

MEA (*Mechanism of Action*): Meccanismo d'azione

MCR (*Maximum Cumulative Ratio*): il rapporto tra la tossicità cumulativa (di miscela) e la massima tossicità espressa dai singoli componenti della miscela. Aiuta nell'identificazione di quelle sostanze contribuiscono maggiormente al rischio da quelli che possono essere esclusi da ulteriori considerazioni nel CRA (Cumulative Risk Assessment).

MCRA (*Monte Carlo Risk Assessment tool*): Strumento per la valutazione del rischio tramite Analisi Monte Carlo

MCS (*Multi-Constituent Substances*): la sostanza è composta da diversi costituenti principali. Ciascuno di questi costituenti principali sarà presente ad una concentrazione compresa tra il 10% e l'80% nella sostanza.

MEC (*Measured Environmental Concentration*): Concentrazione misurata in un comparto ambientale

MRL (*Maximum Residue Level*): Residuo Massimo

- Ammissibile, la massima concentrazione del residuo di sostanza attiva presente sulle derrate agricole, dopo trattamento con un prodotto fitosanitario, in accordo con le Buone Pratiche Agricole (BPA), ossia sulla base del rispetto delle condizioni di impiego (dosi, numero dei trattamenti, intervallo di sicurezza)
- MIE** (*Molecular Initiating Event*): interazione iniziale tra una molecola e una biomolecola o un biosistema che può essere causalmente collegato a un effetto avverso attraverso un percorso
- Mixture**: miscela. Qualsiasi combinazione di due o più sostanze chimiche che possono contribuire congiuntamente a effetti reali o potenziali indipendentemente dalla fonte e dalla vicinanza spaziale o temporale.
- Mixture of concerns**: miscela preoccupante. Miscela di sostanze chimiche oggetto di valutazione del rischio perché vi sono indicazioni che i composti nella miscela/di cui è composta la miscela possono contribuire congiuntamente ad un rischio reale o previsto
- MOA** (*Mode Of Action*): Meccanismo d'azione. Sequenza biologicamente plausibile di eventi chiave in un organismo che porta ad un effetto osservato, comunemente supportato da robuste osservazioni sperimentali e dati meccanicistici. Si riferisce ai passaggi principali che portano a un effetto negativo sulla salute a seguito dell'interazione della sostanza chimica con target biologici. Non implica la piena comprensione del meccanismo d'azione a livello molecolare.
- MOE** (*Margin of Exposure*): margine di esposizione. È utilizzato per considerare possibili problemi di sicurezza derivanti dalla presenza negli alimenti e nei mangimi di sostanze che sono sia genotossiche (cioè che possono danneggiare il DNA, il materiale genetico delle cellule) che cancerogene. In quanto tale, fornisce un'indicazione sul livello di sicurezza dei prodotti alimentari in relazione alla presenza di una sostanza, ma non quantifica il rischio in quanto tale.
- MS** (*Member States*): Stati Membri (Unione Europea)
- MOA** (*Mode Of Action*) descrive un cambiamento funzionale o anatomico, derivante dall'esposizione di un organismo vivente a una sostanza. Esso descrive eventi chiave a vari livelli di organizzazione biologica, a partire dall'interazione cellulare fino ai cambiamenti funzionali e/o anatomici. Il MOA è importante per classificare le sostanze chimiche perché rappresenta un livello intermedio di complessità tra meccanismi molecolari e risultati fisiologici o dell'organismo e fornisce uno schema per la classificazione chimica
- MOET** (*Combined Margin of Exposure*): reciproco della sommatoria dei reciproci dei MOE (*Margin of Safety*). $MOE(T) = 1/[\sum(1/MOE)]$
- NATA** (*National-Scale Air Toxics Assessment*): è strumento di screening dell'Agenzia per l'Ambiente degli Stati Uniti d'America (USEPA) per identificare sostanze inquinanti prioritarie presenti in atmosfera
- NHANES** (*National Health and Nutrition Examination Survey*): è un programma di studi volti a valutare la salute e lo stato nutrizionale di adulti e bambini negli Stati Uniti.
- NIAS** (*Non-Intentionally Added Substances*): Sostanze non aggiunte intenzionalmente: sostanze chimiche presenti in un materiale a contatto con gli alimenti o in un articolo di contatto alimentare, che non sono state aggiunte per motivi tecnici durante il processo di produzione.
- NO(A)EL** (*No Observable (Adverse) Effect Level*): Livello di Non Effetto (avverso) osservabile, la dose più alta alla quale non si osservano effetti
- NOEC** (*No Observed Effect Concentration*): Concentrazione di Non Effetto Osservato
- NRC** (*National Research Council*): Consiglio Nazionale delle Ricerche
- OECD** (*Organisation for Economic Co-operation and Development*): Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE)
- OSPAR** (*Convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic*): Convenzione per la protezione dell'ambiente marino dell'Atlantico nord-orientale
- PARERE** (*EURV ECVAM's Network for Preliminary Assessment of Regulatory Relevance*): rete di regolatori nazionali che fornisce pareri preliminari sulla potenziale rilevanza normativa di metodi o approcci sottoposti a ECVAM EURL per la convalida e / o revisione inter pares (EURL: Laboratori di Riferimento dell'Unione Europea; ECVAM: Centro europeo per la convalida di metodi alternativi).
- PBDE** (*PolyBrominated Diphenyl Ether*): Eteri Difencilici Polibromurati
- PBPK** (*Physiologically based Pharmacokinetic*): modellistica matematica per prevedere l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione (ADME) di sostanze chimiche sintetiche o naturali nell'uomo e in altre specie animali.
- PBPK/PD** (*Physiologically-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic*): In questi modelli viene integrato l'aspetto della farmacodinamica (PD) nei modelli PBPK (*Physiologically based Toxicokinetic*)
- PBT** (*Persistent, Bioaccumulative and Toxic*): Sostanze Persistenti Bioaccumulabili e Tossiche
- PBTK** (*Physiologically based Toxicokinetic*) anche riferito a modelli: sono descrizioni quantitative dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo e dell'escrezione (ADME) di sostanze chimiche nei biota. Questi modelli facilitano la descrizione quantitativa del cambiamento temporale delle concentrazioni di sostanze chimiche e/o dei loro metaboliti nelle matrici biologiche (ad esempio sangue, tessuto, urina) dell'organismo esposto. I modelli tossicocinetici spesso descrivono l'organismo come un insieme di compartimenti che sono caratterizzati fisiologicamente o empiricamente.
- PCB** (*PolyChlorinated Biphenyl*): Bifenili Policlorurati
- PCDD/F** (*Polychlorinated dioxin and furan*): dibenzodiossine e i dibenzofurani policlorurati
- PEC** (*Predicted Environmental Concentration*): Con-

centrazione Ambientale Prevista

PNEC (*Predicted No Effect Concentration*): Concentrazione di Non Effetto Previsto, la concentrazione di una sostanza, in un comparto ambientale al di sotto della quale la probabilità di effetti nocivi è estremamente ridotta

POD (*Point of Departure*): Punto di partenza. In tossicologia, POD è definito come il punto su una curva dose-risposta corrispondente a un livello di basso effetto stimato o nessun livello di effetto (es. NOEL o Livello di non effetto avverso osservato).

PODI (*Point of Departure Index*): sommatoria dei rapporti tra i livelli di esposizione (EL) e i POD (Punto di partenza) delle sostanze presenti in miscela; chiamato anche indice del punto di riferimento, RPI, *Reference Point Index*

PPDB (*Pesticide Property Database*) Database sulle proprietà fisico-chimiche ed ecotossicologiche dei prodotti fitosanitari. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/>.

PPP (*Plant Protection Product*): Prodotti Fitosanitari

PTI (*Pesticide Toxicity Index*): Indice di tossicità dei pesticidi; è un indicatore utilizzato per stimare la tossicità di miscela negli ambienti acquatici

QA/QC (*Quality Assurance/Quality Control*): Garanzia di qualità/Controllo di qualità

QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*): Relazioni Quantitative Struttura-Attività (modelli per la previsione degli effetti)

RA (*Risk Assessment*): Valutazione del rischio

RA (*Response Addition*): Per miscele di sostanze chimiche che agiscono meccanismi di azione differenti, gli effetti possono essere stimati direttamente dalla probabilità di risposta ai singoli componenti (Response Addition)

RAGS (*Risk Assessment Guidance for Superfund*): Linea Guida per la valutazione del rischio di siti contaminati per la salute umana e l'ambiente (programma USEPA)

RBA (*Risk-Based Approach*): Approccio basato sul rischio: comprensione del livello di rischio per l'uomo e per l'ambiente per applicare misure di mitigazione.

RfD/RfC (*Reference Dose/Concentration*): Dose (concentrazione) di riferimento: è la dose (concentrazione) massima accettabile che molto probabilmente è priva di un rischio apprezzabile di effetti deleteri nel corso della vita.

RfPI (*Reference Point Index*): Analogo al POD (vedi). Punto definito su una relazione sperimentale dose-risposta per l'effetto critico (cioè l'effetto biologicamente rilevante che si verifica al livello di dose più basso). Questo termine è sinonimo di punto di partenza (USA). I punti di riferimento includono il livello di effetto avverso più basso o nessun effetto osservato (LOAEL/NOAEL, *lowest or no observed adverse effect level*) o il limite di confidenza inferiore della dose di riferimento (BDML, *benchmark*

dose lower confidence limit), utilizzato per ricavare un valore di riferimento o un margine di esposizione nella valutazione del rischio per la salute umana e animale. In ambito ecologico, questi includono le seguenti concentrazioni: dose letale (LD₅₀), concentrazione di effetto (EC₅/EC_x), nessuna concentrazione/dose (effetto avverso) (NOEC/NOAEC/NOAED) e nessun livello di effetto (avverso) (NEL/NOAEL)

REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*): Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione delle Sostanze Chimiche (Regolamento UE)

Reference value: Valore di riferimento. La dose massima stimata (in base alla massa corporea) o la concentrazione di un agente al quale un individuo può essere esposto per un determinato periodo senza rischi apprezzabili. I valori di riferimento sono stabiliti applicando i fattori di valutazione al punto di riferimento (*Reference point*). Esempi di valori di riferimento nella salute umana includono la dose giornaliera accettabile (ADI, *acceptable daily intake*) per gli additivi alimentari e mangimi e i pesticidi, i livelli massimi tollerabili di assunzione (UL, *tolerable upper intake levels*) per vitamine e minerali e l'assunzione giornaliera tollerabile (TDI, *tolerable daily intake*) per contaminanti e materiali a contatto con gli alimenti. Esempi per gli effetti acuti e gli operatori sono la dose acuta di riferimento (ARfD, *the acute reference dose*) e il livello di esposizione accettabile dell'operatore (AOEL, *acceptable operator exposure level*). Nella salute degli animali, questi includono concentrazioni di mangimi sicuri. Nell'area ecologica, i valori di riferimento includono la concentrazione prevista senza effetto (PNEC), la concentrazione di pericolo (HC₅) come input per le distribuzioni di sensibilità delle specie (SSD) per proteggere l'intero ecosistema

Response addition: additività di risposta o Risposta addizionale. Un modello basato su componenti in cui essi sono trattati come se avessero un'azione indipendente o diversa, cioè seguendo il concetto statistico di eventi casuali indipendenti. L'applicazione dell'additività di risposta richiede che i dati sulla tossicità (ad esempio mortalità, tossicità degli organi bersaglio) siano espressi come frazione (tra 0 e 1), vale a dire la percentuale di individui in una popolazione o specie in un ecosistema interessato dall'esposizione combinata o che superano un punto di riferimento (ad esempio BDML, EC₅₀). Il termine "additività di risposta" è un termine improprio in quanto le risposte in realtà non vengono aggiunte, ma le frazioni non influenzate della popolazione sono moltiplicate.

RPF (*Relative Potency Factor*): esprime la potenza tossica dei singoli componenti della miscela rispetto al cosiddetto Index Compound (IC). L'IC è uno dei componenti della miscela con presenza e tossicità ben note.

RQ (*Risk Quotient*): Quoziente di Rischio: dato dal rapporto tra un livello di esposizione previsto (PEC) e una concentrazione prevista di non effetto (PNEC)

RV (*Reference value*): Valore di riferimento

SAR (*Structure Activity Relationship*): Relazioni Struttura-Attività

SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*): è un Comitato scientifico della UE che fornisce pareri sui rischi per la salute e la sicurezza (rischi chimici, biologici, meccanici e altri rischi fisici) di prodotti di consumo non alimentari e di servizi (es. tatuaggi, abbronzatura artificiale).

SCENHIR (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*): è un Comitato scientifico della UE che fornisce pareri sui rischi sanitari e ambientali emergenti o appena identificati e su questioni ampie, complesse o multidisciplinari che richiedono una valutazione globale dei rischi per la sicurezza dei consumatori o la salute pubblica e questioni connesse non coperte da altri organismi comunitari di valutazione del rischio.

SCHER (*Scientific Committee on Health and Environmental Risks*): è un Comitato scientifico della UE per i rischi sanitari e ambientali è uno dei comitati scientifici indipendenti gestiti dalla direzione generale per la salute e la tutela dei consumatori della Commissione europea, che forniscono consulenza scientifica alla Commissione su questioni relative ai prodotti di consumo

SE (*Short-term Exposure*) Esposizione a breve termine

SFD (*Soil Framework Directive*): Direttiva Quadro sul suolo

STU (*Sum of Toxic Unit*) Sommatoria delle Unità di Tossicità (\sum TU)

TDI (*Tolerable Daily Intake*): Assunzione giornaliera tollerabile si riferisce alla quantità giornaliera di una sostanza chimica che è stata valutata sicura per l'essere umano a lungo termine

TEF (*Toxic Equivalence Factor*): fattore di tossicità equivalente esprime la tossicità di diossine, furani e PCB in termini del congenere più tossico tra le diossine (2,3,7,8-TCDD)

TEQ (*Toxic Equivalency*): tossicità equivalente; si ottiene sommando i prodotti tra i valori TEF dei singoli congeneri e le rispettive concentrazioni, espresse con l'unità di misura della matrice in cui vengono ricercate.

TIE (*Toxicity Identification Evaluation*): studio sito-specifico per isolare, identificare e confermare gli agenti causali di tossicità in un effluente. Il TIE è condotto sulla base di procedure promulgate dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (USEPA).

TK (*Toxicokinetics*): tossicocinetica

TK-TD (*Toxicokinetic-Toxicodynamic modelling*) Tossicocinetica-tossicodinamica (modelli di). La Tossicocinetica si riferisce alla descrizione matematica di come le concentrazioni di un tossico nel sito di azione cambiano nel tempo. I processi che contribuiscono alla tossicocinetica di un tossico sono l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e

l'escrezione. La tossicodinamica si riferisce alla descrizione quantitativa degli effetti di un tossico su un sistema biologico. Questi effetti includono una gamma di endpoint e prodotti, che vanno dal livello molecolare, alle cellule, ai tessuti, ai sistemi di organi e alle caratteristiche del ciclo vitale. Vedi anche: Gehring and van der Merwe (2014)

ToR *Terms of Reference*: termini di riferimento

TTC – ecoTTC (*Thresholds of Toxicological Concern*): soglia di allarme tossicologico per la valutazione qualitativa del rischio associato a sostanze presenti nella dieta in quantità infinitesimali. L'approccio può essere impiegato nella valutazione iniziale di una data sostanza, per decidere se occorra compiere una valutazione completa dei rischi o meno. Il metodo può anche essere utilizzato per stabilire una scala di priorità tra sostanze chimiche che ingenerino bassa esposizione, ma richiedano maggiori dati, anziché tra sostanze che non si presume causino rischi apprezzabili per la salute umana.

TU (*Toxic Unit*): Unità di Tossicità

TUS (*Toxic Unit Summation*): Sommatoria delle Unità di Tossicità

TTD (*Target organ Toxicity Dose*): dose che produce effetti tossici specifici per organi bersaglio

UF (*Uncertainty Factor*): Fattore di Incertezza

Unintentional mixtures (*substances from different sources, deposited separately at a particular site, e.g. in surface water*): Miscele non prodotte in maniera intenzionale (es PCBs) che si formano in un determinato ambiente a partire da sorgenti differenti e attraverso diversi percorsi ambientali

US EPA (*United States Environmental Protection Agency*): Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti d'America

UVCB (*Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials*): in ambito REACH, sostanze dalla composizione sconosciuta o variabile, prodotti di reazioni complesse o materiali biologici.

VOC (*Volatile Organic Compound*): Composti Organici Volatili

vPvB (*very Persistent, very Bioaccumulative*): Sostanze molto persistenti e molto bioaccumulabili

WC (*Worst Case*): Caso peggiore

WET (*Whole Effluent Testing*): descrive l'effetto tossico complessivo (letalità, crescita alterata o riproduzione) di un effluente. Questi test non richiedono l'identificazione degli inquinanti presenti nell'effluente.

WFD (*Water Framework Directive*): Direttiva Quadro sulle Acque

WHO (*World Health Organization*): Organizzazione Mondiale della Sanità

WHO/IPCS (*World Health Organisation/International Programme on Chemical Safety*): programma in-

ternazionale sulla sicurezza chimica (IPCS), dell'Organizzazione Mondiale della Sanità

WMA (*Whole Mixture Approach*): valutazione di rischio diretta degli effetti di una miscela di sostanze chimiche (es. campione ambientale). La miscela è trattata come un'unica entità, simile a singole sostanze chimiche, e quindi richiede informazioni dose-risposta per la miscela di preoccupazione o una miscela (sufficientemente) simile. Poiché l'effetto della miscela viene valutato nel suo insieme, qualsiasi interazione sinergica o antagonista tra i composti è intrinsecamente considerata nelle risposte osservate

WoE (*Weight of Evidence*): peso dell'evidenza; è una strategia che combina informazioni provenienti da diverse fonti indipendenti per ottenere evidenza sufficiente ad adempiere a una prescrizione in materia di informazione.

WWTP (*Waste Water Treatment Plant*): Impianti di depurazione delle acque reflue

Proposta metodologica per la gestione delle miscele di sostanze chimiche nell'ambiente

a cura di

Antonio Finizio (*) - *Università degli Studi di Milano Bicocca, Dl.to di Scienze dell'Ambiente e della Terra*

Anna Barra Caracciolo, Paola Grenni, *Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Roma*

RIASSUNTO

Il modello Additività di Dose/Concentrazione (*Concentration Addition*) è quello generalmente utilizzato (sia dalla letteratura scientifica che a livello europeo) nella valutazione teorica del rischio ambientale per prevedere la tossicità di una miscela di sostanze; tale modello riflette un approccio di "caso peggiore" qualora non vi siano informazioni sulla tossicità della miscela. Il modello *Concentration Addition* è un utile "screening" della tossicità potenziale complessiva di una miscela. In questo modello si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d'azione. La tossicità della miscela viene calcolata ed espressa in termini di unità di tossicità (TU, *Toxic Unit*), ovvero sommando le concentrazioni misurate o previste di ciascun componente della miscela, normalizzate rispetto ad un *endpoint* ecotossicologico.

Con il modello additività di dose/concentrazione viene valutata la potenza di tossicità della miscela (TUm) che si calcola come somma delle frazioni di unità di tossicità delle singole sostanze. Le frazioni di unità di tossicità (xTU) per le singole sostanze vengono calcolate come rapporto tra la concentrazione del singolo contaminante e la relativa EC₅₀ o LC₅₀ per ciascuno degli organismi di tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce).

Il concetto di TU permette dunque il calcolo del rischio di una miscela su ogni singolo organismo considerato e rappresentativo di un livello trofico (es. alga, dafnia, pesce) combinando gli effetti di tutte le sostanze presenti nella miscela. Sommando le frazioni di tossicità, se il valore di TU è =1 (o vicino a questo valore) si considera che la miscela presa in esame abbia un effetto ecotossicologico.

Il modello è stato applicato a diversi scenari italiani di acque superficiali.

SUMMARY

The Concentration Addition model is generally used in the scientific literature and at European level for the environmental risk assessment to predict the toxicity of a chemical mixture; this model reflects a "worst case" approach if there is no information on the toxicity of the mixture.

The Concentration Addition model is a useful for screening the overall toxicity of a chemical mixture. This model assumes that all substances have the same mode of action. The mixture toxicity is calculated and expressed in terms of Toxic Unit (TU), i.e. by adding the measured or predicted concentrations of each chemicals in the mixture, normalized with an ecotoxicological endpoint.

The concentration addition model evaluates the toxicity potency of the mixture (TUm), which is calculated as the sum of the toxicity unit fractions of the single substances. The toxicity unit fractions (xTU) for the single substances are calculated as the ratio of the concentration of the single contaminant to the relative EC₅₀ or LC₅₀ for each organisms of three trophic levels (alga, daphnia and fish).

The concept of TU therefore allows the calculation of the risk of a mixture on each organism considered and representative of a trophic level (e.g. alga, daphnia, fish) combining the effects of all the substances present in the mixture. If the value of the sum of the toxicity fractions TU is =1 (or close to this value) the chemical mixture is considered to have an ecotoxicological effect.

The model was applied to several Italian surface water scenarios.

Dall'analisi critica della letteratura scientifica riportata nel precedente articolo inerente alla tematica della valutazione e gestione del rischio per l'uomo e per l'ambiente derivante dall'esposizione contemporanea a più sostanze chimiche è emersa una significativa sovrapposibilità dei contenuti ad indicare che ad oggi c'è una sostanziale convergenza sugli approcci utilizzabili.

Come evidenziato precedentemente, una miscela di rilevanza ambientale è il risultato di diverse emissioni, siano esse puntiformi o diffuse. In particolare, si possono avere:

- Miscele da scarichi urbani (contaminanti emergenti, sostanza organica, ecc.);
- Miscele da scarichi industriali (es. industrie);
- Miscele di origine agricola (es. pesticidi);
- Miscele da discariche e inceneritori (es. PCB e diossine).

In alcuni casi le miscele di composti chimici a diversa concentrazione vengono prodotte durante un particolare processo, oppure sono intenzionalmente utilizzate e rilasciate nell'ambiente (es. PCBs).

Molto più frequente è il caso di miscele derivanti da

* antonio.finizio@unimib.it

Tabella 1. Possibili azioni di una miscela

	meccanismo d'azione simile	meccanismo d'azione diverso
nessuna interazione	semplice (additività)	indipendente
interazione	complesso (sinergia o antagonismo)	dipendente (sinergia o antagonismo)

composti non correlati tra di loro dal punto di vista commerciale.

In particolare si riportano di seguito brevemente alcune considerazioni.

1. CONSIDERAZIONI PRELIMINARI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI UNA MISCELA DI SOSTANZE

Per studiare e descrivere le possibili azioni di una miscela è necessario prendere in considerazione due parametri: l'interazione fra le sostanze presenti in miscela ed il meccanismo d'azione delle stesse. Le relazioni fra questi due parametri sono riassunte nella tabella 1.

Infine, quando due sostanze presentano un meccanismo d'azione simile significa che hanno lo stesso sito primario dove espletano l'azione tossica (in caso contrario si avranno dei meccanismi d'azione differenti).

2. CONSIDERAZIONI SULL'APPROCCIO

Nella valutazione delle miscele si suggerisce lo schema classico di *risk assessment* come avviene per le sostanze singole (varie fasi: *problem formulation*, *effect analysis*, *exposure analysis*, *risk characterization*). È possibile seguire un approccio a *Tier* (secondo la logica di *risk refinement*), in cui c'è la possibilità di rivisitare le assunzioni fatte precedentemente per rendere la valutazione più realistica (in genere si parte da uno scenario di caso peggiore o *worst case*). Con il termine interazione si intende quella situazione in cui una sostanza interferisce nell'attività biologica delle altre. La sinergia si verifica quando l'effetto tossico di una miscela è maggiore della somma degli effetti che si avrebbero considerando le sostanze singolarmente. L'antagonismo si presenta, invece, quando la tossicità della miscela è minore della somma degli effetti delle sostanze prese singolarmente. Non esistono ad oggi approcci per prevedere la tossicità di miscela nel caso vi siano interazioni tra i componenti.

3. CONSIDERAZIONI SULLA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI

Per quanto riguarda la valutazione degli effetti ci si può riferire ad un approccio *whole-mixture* (WM) o *component-based* (CB). Nel WM si usano le assunzioni e i metodi disponibili per singole sostanze, e la miscela viene considerata proprio come se fosse un unico contaminante. Per poter applicare questo ap-

proccio devono essere disponibili dati di tossicità dell'intera miscela, o quantomeno di una miscela molto simile. L'approccio WM ha il vantaggio di tener conto di tutte le componenti non identificate della miscela e di tutte le interazioni che possono avvenire fra le sostanze che la costituiscono. Tuttavia, non può essere applicata a miscele non stabili nel tempo. L'approccio *component-based* (CB), invece, prevede la conoscenza e la caratterizzazione di tutti i componenti di una miscela, in particolare per quanto riguarda il relativo meccanismo d'azione. A tal proposito, per prevedere la tossicità di una miscela, sono disponibili due differenti modelli, rispettivamente per sostanze che presentano il medesimo meccanismo d'azione e per sostanze che agiscono in maniera differente: **Additività di Dose/Concentrazione** (CA, *Concentration Addition*) e Additività di Risposta/Effetti, conosciuto come modello di Azione Indipendente (IA, *Independent Action*).

In genere, le informazioni disponibili sul rischio derivante dalla presenza di miscele di contaminanti negli ecosistemi acquatici sono relativamente scarse. Infatti, solo occasionalmente:

- i) la composizione di una miscela è nota (frequentemente alcuni componenti della miscela sono sconosciuti);
- ii) i livelli di esposizione sono conosciuti (le concentrazioni dei costituenti la miscela variano con il tempo);

Inoltre:

- iii) i dati ecotossicologici sui singoli componenti della miscela sono spesso limitati;
- iv) gli effetti della miscela sugli organismi acquatici sono poco conosciuti.

Di conseguenza, in un'ottica di gestione del rischio da miscele negli ambienti acquatici, si devono affrontare problemi legati alla:

- 1) definizione delle modalità con cui una miscela si forma nell'ambiente (origine);
- 2) valutazione della tossicità della miscela.

In assenza di informazioni, il modello di additività di dose/concentrazione è generalmente accettato nella valutazione del rischio ambientale come approccio di caso peggiore (si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d'azione). È questo il modello che dunque viene scelto da applicare a diversi casi di studio locali a livello di territorio nazionale.

Il modello di additività di dose/concentrazione (modello di Löewe, *Concentration Addition*, CA⁽¹⁾) per valutare l'ecotossicità delle miscele è basato sul principio di diluizione ed è stato disegnato per sostanze chimiche con meccanismo di azione simile.

L'approccio basato sui componenti (*component-based approach*), che si basa principalmente sul modello di azione indipendente (IA) o sul modello di aggiunta di concentrazione (CA), è una delle migliori opzioni, almeno per il primo livello della valutazione

⁽¹⁾ Loewe S, Muischnek H (1926) *Combinated effects I Announcement - Implements to the problem. Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 114: 313-326

del rischio.

Questi approcci consentono di prevedere l'effetto delle miscele senza dati aggiuntivi sulla tossicità della miscela e considera che le interazioni sinergiche (più forti di quelle additive) o compensative (più deboli di quelle additive) tra le sostanze chimiche componenti della miscela siano assenti o trascurabili⁽²⁾.

Tale modello è quello generalmente riconosciuto sia dalla letteratura scientifica che a livello europeo nella valutazione teorica del rischio ambientale come approccio di "caso peggiore"⁽³⁾.

Tale modello è quello scelto ed applicato a diversi casi di studio (si veda l'articolo nelle pagine successive). Nel modello viene assunto che tutte le sostanze abbiano lo stesso meccanismo d'azione, non esistendo informazioni dettagliate di ecotossicità su tutte le sostanze inquinanti esistenti. Esso viene utilizzato in una fase preliminare della valutazione del rischio delle miscele qualora non vi siano informazioni ecotossicologiche della miscela e delle interazioni (sinergiche, antagoniste ecc.) tra due o più delle sue componenti. I dati ecotossicologici e tossicologici relativi agli effetti delle miscele sono attualmente assenti o molto limitati considerando soprattutto i contaminati emergenti e sono praticamente infinite le combinazioni di diverse sostanze e le relative combinazioni.

Il modello di additività viene preso in considerazione come un utile "screening" della tossicità potenziale complessiva di una miscela.

Con il modello additività di dose/concentrazione viene valutata la potenza di tossicità della miscela (TU, Toxic Unit, unità di tossicità) che si calcola come somma delle frazioni di unità di tossicità delle singole sostanze (per questo motivo il modello è chiamato additività di dose/concentrazione). Le frazioni di unità di tossicità (xTU) per le singole sostanze è calcolato come frazione tra la concentrazione del singolo contaminante e della relativa EC₅₀ o LC₅₀ per gli organismi di tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce). Sommando le frazioni di tossicità, se il valore di sommatoria è =1 (o vicino a questo valore) si considera che la miscela di sostanze prese in esame abbia un effetto ecotossicologico. Uno dei principali vantaggi è quello di mettere in evidenza quale delle sostanze ha maggior

"peso" di ecotossicità nella miscela, cioè quella che è "trainante" nella tossicità della miscela.

Nei casi specifici (sia reali con dati di monitoraggio misurati, si teorici con dati di concentrazione dei contaminanti desunti mediante modellistica) a cui è stato applicato questo modello, i dati di EC₅₀ o LC₅₀ sono quelli riportati nei siti ufficiali riconosciuti (ECHA, The PPDB-Pesticide Properties Database, The VSDB-Veterinary Substances Database, ECOTOX dell'EPA, VEGA dell'Istituto Mario Negri ed alcune fonti bibliografiche internazionali)⁽⁴⁾. In particolare sono stati considerati i dati di LC₅₀ per i pesci ed i valori di EC₅₀ per dafnia e alghe.

Il modello proposto ha il grande vantaggio, dunque, di mettere in evidenza nelle miscele considerate quali siano le sostanze che hanno un maggior contributo nella tossicità di una miscela, e dunque di poter fare su tali sostanze delle considerazioni di prevenzione.

Ovviamente sarebbero auspicabili, a valle di ogni screening, ulteriori approfondimenti, soprattutto per quelle miscele che mostrano una potenza di tossicità >1. Questo, comunque, richiede lunghe e costose attività sperimentali.

4. CONSIDERAZIONI SUI LIVELLI DI ESPOSIZIONE

Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di esposizione si può partire da una dose/concentrazione nota dei singoli componenti della miscela (MEC: Measured Environmental Concentration), oppure da una stima ottenuta attraverso l'uso dei modelli previsionali (PEC: Predicted Environmental Concentration).

4. CONSIDERAZIONI SULLA SOMMATORIA DELLE UNITA' DI TOSSICITA'

Nella fase di caratterizzazione del rischio esistono diversi metodi per applicare il concetto di additività di dose/concentrazione delle miscele. Tra questi, come già accennato precedentemente, molto utilizzato nella valutazione del rischio ecologico è l'approccio basato sulla sommatoria delle Unità di Tossicità (TU).

Vengono prima calcolate le frazioni di unità di tossicità (xTU) che sono il rapporto tra le concentrazioni dei contaminanti (misurate o previste) e il loro effetto ecotossicologico (considerando gli organismi acquatici, sarà l'EC₅₀ o l'LC₅₀ riferito a singoli organismi di tre livelli trofici, es. alga, dafnia e pesce). L'unità di tossicità viene calcolata secondo la seguente formula:

$$TU = \sum_i^n ([Conc_i]/LC_{50i_org})$$

ovvero sommando le concentrazioni misurate (MEC) o previste (PEC) di ciascun componente della miscela, normalizzate rispetto ad un endpoint ecotossicologico

⁽²⁾ Cedergreen N, Christensen AM, Kamper A, Kudsk P, Mathiassen SK, Streibig JC, Sorenson H. 2008. A review of independent action as a reference model for binary mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ Toxicol Chem* 27:1621-1632.

Backhaus T, Faust M. 2012. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environ Sci Technol* 46:2564-2573.

Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M. 2013. Simplifying complexity: Mixture toxicity assessment in the last 20 years. *Environ Toxicol Chem* 32:1685-1687.

Rodney SI, Teed RS, Moore DRJ. 2013. Estimating the toxicity of pesticide mixtures to aquatic organisms: A review. *Hum Ecol Risk Assess* 19:1557-1575)

⁽³⁾ Boedeker W., Drescher K., Altenburger R., Faust M., Grimme L.H. 1993. Combined effects of toxicants: the need and soundness of assessment approaches in ecotoxicology. *Sci Total Environ*. 134 (2): 931-939

⁽⁴⁾ <https://echa.europa.eu/it/> .

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/index.htm>

<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

<https://www.vegahub.eu/>

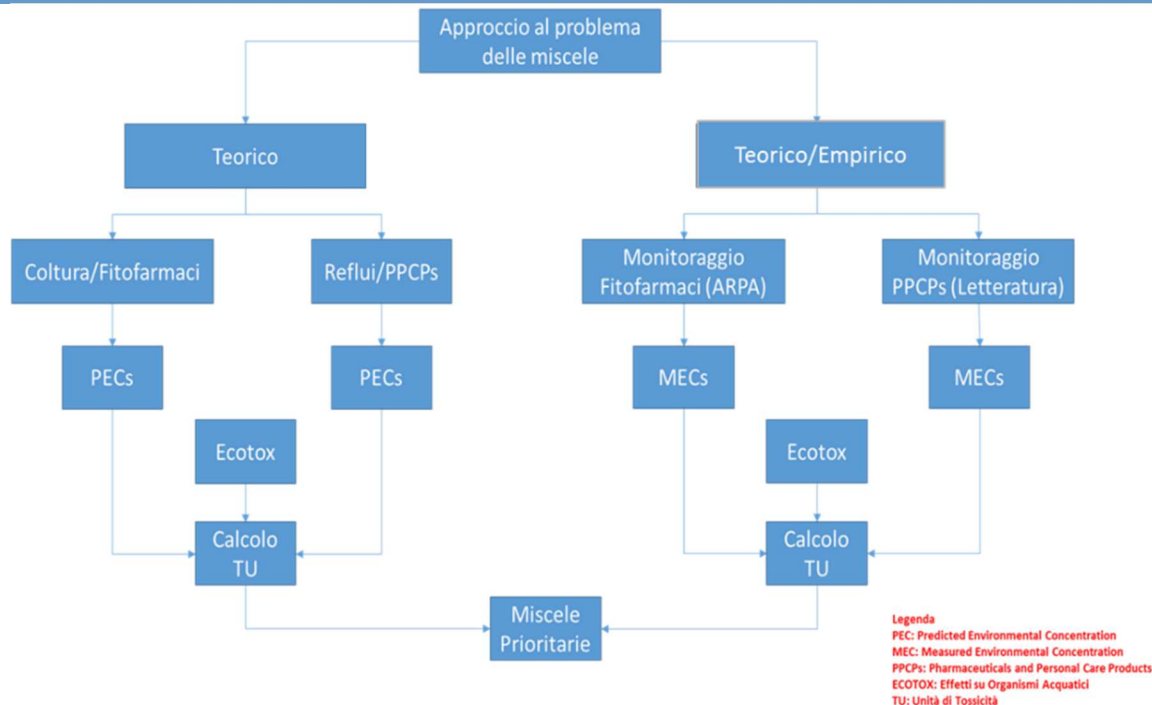


Figura 1. Metodologia per la gestione delle miscele di sostanze chimiche. Lo schema riporta un approccio teorico (sulla sinistra) adottato per fitofarmaci ed emergenti ed uno teorico/empirico (sulla destra) per sostanze normate ed emergenti. Il modello di additività dose/concentrazione è stato applicato a concentrazioni teoriche (PECs: *predicted environmental concentrations*) e misurate (MECs: *measured environmental concentrations*) per il calcolo delle unità di tossicità (TU)

(LC₅₀ o EC₅₀).

Il concetto di TU permette il calcolo del rischio di una miscela su ogni singolo organismo considerato e rappresentativo di un livello trofico (es. alga, dafnia, pesce) combinando gli effetti di tutte le sostanze presenti nella miscela.

6. CONSIDERAZIONI INERENTI AL CONTRIBUTO DEI SINGOLI COMPONENTI ALLA TOSSICITA' COMPLESSIVA

Un altro elemento emerso dall'analisi della documentazione è che, in genere, sono pochi i componenti della miscela che contribuiscono in maniera rilevante alla tossicità della miscela. Da un punto di vista gestionale, questo aspetto è molto rilevante in quanto eliminando o riducendo i livelli di esposizione di queste sostanze, si ridurrebbe di molto la tossicità totale della miscela.

In base alla tipologia del processo produttivo è possibile individuare una lista di "miscele prioritarie" su cui sarebbe necessario approfondire le conoscenze. È bene precisare che con il termine prioritarie non vanno intese quelle miscele in cui siano presenti sostanze prioritarie (come definita dalla regolamentazione UE), ma quelle combinazioni di sostanze che hanno un'elevata possibilità di originarsi come emissioni di rilevanti attività produttive. A titolo di esempio, una coltura agraria può essere considerata un processo produttivo che nel tempo emette nei corpi idrici (deriva o ruscellamento) una serie di miscele di sostanze chimiche a composizione variabile sia nella tipologia dei costituenti che nelle loro relative concentrazioni. Tuttavia, avendo a disposizione una serie di

informazioni (es. numero e tipologia di prodotti utilizzati) potrebbe essere possibile arrivare a caratterizzare e definire quelle più pericolose per l'ambiente acquatico.

A scala più ampia, ad esempio di bacino idrografico, è necessario prendere in considerazione la possibilità che siano presenti, simultaneamente e nello stesso corpo idrico, miscele di diversa origine, in base alle diverse attività produttive presenti nell'area considerata. La presenza delle miscele dovrebbe essere considerata mediante uno studio sull'uso del territorio. In prima analisi, tuttavia, la disponibilità di dati di monitoraggio (anche se non esaustiva) potrebbe essere utile per iniziare ad identificare miscele prioritarie su cui eventualmente intervenire con delle misure di mitigazione.

Spostandosi a livelli di scala regionale e continentale, la descrizione di specifiche miscele diventa praticamente impossibile, dato che il numero delle sostanze chimiche potenzialmente presenti è teoricamente enorme. In ogni caso, sarebbe necessario applicare criteri di *cut off* per valutare fino a che punto il contributo di una certa sostanza è giudicabile non trascurabile alla risposta complessiva della miscela.

7. SCALA SPAZIALE / TEMPORALE

Infine, un altro aspetto importante nello studio delle miscele è la definizione della scala spaziale. Infatti, a scala locale le miscele possono essere teoricamente caratterizzate più facilmente, sia da un punto di vista qualitativo (numero e tipologia di componenti) che quantitativamente (concentrazione di ciascun componente). Di conseguenza anche i possibili effetti sulle

comunità biologiche possono essere valutati applicando il metodo migliore (es. *Concentration Addition*, CA; *Independent Action*, IA).

8. APPROCCIO TEORICO E TEORICO/EMPIRICO PER LE DIVERSE TIPOLOGIE DI CONTAMINANTI

Sulla base di quanto sopra descritto, nella Figura 1 viene riportato la metodologia utilizzata per la valutazione del rischio delle miscele con il modello di additività dose/concentrazione. In particolare, è stato applicato un approccio teorico/empirico (basato su dati misurati da monitoraggio: MECs e dati di letteratura di effetto, es. LC₅₀/EC₅₀), e teorico (basato su modelli previsionali per calcolare le PECs e dati di letteratura di effetto).

Applicando un approccio teorico ed uno teorico/empirico, il modello CA è stato applicato in **maniera prospettica** (teorico previsionale, parte sinistra dello schema) per prevedere la formazione di una miscela nell'ambiente o in **maniera retrospettiva** (teorico/empirica, parte destra dello schema), utilizzando i dati di monitoraggio disponibili per la valutazione del rischio da miscela. I risultati ottenuti relativi alla potenza di tossicità sono stati utili al fine di individuare e visualizzare eventuali miscele prioritarie. **Per miscele prioritarie si intende miscele che hanno alta probabilità di formazione nell'ambiente e che rappresentano un realistico pericolo per gli ecosistemi.**

Per quanto riguarda l'**approccio Teorico/Empirico** (parte destra dello schema di Figura 1), sono stati utilizzati dati di monitoraggio ambientale (concentrazioni misurate, MEC: *Measured Environmental Concentration*) di corpi idrici superficiali (forniti da ARPA regionali o tratti da alcune pubblicazioni internazionali) rappresentativi del territorio italiano per applicare il modello proposto di additività dose/concentrazione. Le miscele identificate sono dunque state caratterizzate dal punto di vista della tossicità e del rischio utilizzando il modello, includendo sia contaminanti normati che emergenti. I risultati ottenuti relativi alla potenza di tossicità sono stati georeferenziati (mappe tematiche), per avere una descrizione spaziale e temporale della potenza delle miscele, individuando eventuali miscele prioritarie.

L'**approccio teorico** (parte sinistra della Figura 1) ha previsto l'uso della modellistica previsionale per il calcolo dei livelli di esposizione e l'uso del modello CA per la caratterizzazione del rischio di miscela considerando sia contaminanti normati che emergenti. L'approccio teorico è stato applicato a tre casi studio: due colture agrarie (mais e melo) e un impianto di depurazione (Passo del Tonale).

Per quanto riguarda le colture agrarie (contaminanti normati), i dati utilizzati sono quelli relativi ai prodotti fitosanitari registrati sulle colture selezionate, le loro quantità utilizzate, nonché le proprietà chimico-fisiche e di degradabilità. Per stimare le potenziali concentrazioni in acqua dei pesticidi (PEC: *Predicted Environmental Concentration*), sono stati applicati i modelli FOCUS, utilizzati nelle procedure di registrazione dei pesticidi, definendo, nel tempo, le tipologie di miscela emesse dalla coltura (numero di componenti e rapporti di concentrazione tra di essi).

Combinando tali concentrazioni con le informazioni sulla tossicità dei costituenti nei confronti degli organismi acquatici con l'applicazione del modello *Concentration Addition*, è stata valutata la potenziale tossicità delle miscele. Infine, tramite criteri di *cut off*, è stato possibile identificare le miscele prioritarie emesse nel tempo da ciascuna coltura considerata.

Analogamente, per quanto riguarda l'impianto di depurazione (essenzialmente contaminanti emergenti), sono state stimate le potenziali concentrazioni in acqua, a valle dello scarico, dei contaminanti seguendo i principi generali forniti dalle linee guida europee in merito alla valutazione del rischio ambientale di sostanze chimiche nuove ed esistenti (EU TGD, EC 2003)⁽⁵⁾ e per l'autorizzazione al commercio di farmaci ad uso umano (EMA, 2006)⁽⁶⁾. In particolare è stata creata una banca dati di farmaci ad uso umano e prodotti per la cura personale, di maggior utilizzo nelle aree considerate, contenente i dati necessari per l'applicazione della metodologia (consumo dei principi attivi, proprietà chimico-fisiche, tassi di escrezione umana, rimozione negli impianti di depurazione delle acque reflue, dati ecotossicologici, ecc.); è stata stimata sia l'esposizione delle sostanze considerate (concentrazione potenzialmente rinvenibile nelle acque superficiali, EC_{sw}: *Predicted Environmental Concentrations in surface water*) sia gli effetti mediante il calcolo delle PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) per gli organismi non target rappresentativi dell'ambiente acquatico. Infine sono state calcolate le frazioni di unità di tossicità (xTU, PEC_i/PNEC_i dove i è la i-esima sostanza) e della potenza delle miscele (Σ TU).

Si vuole nuovamente sottolineare che il modello *Concentration addition* selezionato è stato applicato non solo a casi di studio specifici mediante l'uso di dati di monitoraggio ambientale ma anche a contaminanti normati ed emergenti modellizzando la previsione della loro concentrazione in acque superficiali sia in scenari culturali specifici che in un impianto di depurazione.

⁽⁵⁾ European Commission. 2003. *Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk assessment to new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Ispra (IT): European Chemicals Bureau. 1009 p*

EMA, European Medicines Agency, 2006. *Environmental risk assessment of medicinal products for human use. <https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use>*

⁽⁶⁾ EMA, European Medicines Agency, 2006. *Environmental risk assessment of medicinal products for human use. <https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use>*

Applicazione del modello di additività di dose / concentrazione a scenari di riferimento italiani

a cura di

Antonio Finizio, Andrea Di Guardo - *Università degli Studi di Milano Bicocca, Dl.to di Scienze dell'Ambiente e della Terra*

Anna Bruna Petrangeli, Anna Barra Caracciolo, Paola Grenni (*), *Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Roma*

RIASSUNTO

Nel presente lavoro viene riportata l'applicazione dell'approccio metodologico descritto nel precedente articolo, al fine di valutare il rischio ecologico delle miscele di sostanze chimiche nei corpi idrici. I dati chimici utilizzati sono quelli di monitoraggio di routine delle acque (MEC: concentrazioni ambientali misurate) ottenuti da ISPRA e dalle agenzie regionali per l'ambiente (per i dati di contaminazione ambientale da sostanze organiche normate) oppure dati provenienti da pubblicazioni scientifiche per le sostanze cosiddette emergenti (per le quali, seppur ne è stata riconosciuta la presenza diffusa nell'ambiente, non sono ancora state stabilite le concentrazioni di effetto e i limiti di concentrazione, perciò ancora non comprese nella normativa). Tali dati, per ogni stazione di monitoraggio, sono stati georeferenziati in un unico sistema di coordinate. Infatti tale approccio può essere anche applicato a dati ambientali previsti (PEC, calcolati mediante modellistica previsionale). La tossicità complessiva della miscela viene quindi valutata per tre organismi rappresentativi dell'ambiente acquatico (alga, Daphnia, pesce) utilizzando il modello di additività dose/concentrazione che mette in relazione l'esposizione (dati di concentrazione) con i dati ecotossicologici (EC_{50} , LC_{50}) presi da diversi database ufficiali). Successivamente è stato realizzato un sistema per facilitare la creazione, l'organizzazione e la gestione del grande set di dati che viene generato. I risultati della tossicità delle miscele sono stati poi rappresentati in mappe e tabelle del rischio di miscela basate su GIS (che riportano l'unità tossica delle miscele e delle singole sostanze). Tali informazioni sono utili per ulteriori elaborazioni quali l'individuazione di miscele prioritarie (miscele che risultino molto frequenti ed abbiano valori di unità di tossicità elevati). Tali elaborazioni possono essere utili al fine di una gestione delle sostanze che possono destare maggiore preoccupazione. Il metodo è stato applicato a diversi casi di studio comprendenti aste fluviali e dati puntuali, a monte e/o a valle di impianti di trattamento civile, nonché dati di monitoraggio ambientale previsti in colture agrarie e per un impianto di depurazione.

A titolo esemplificativo, vengono riportati i risultati e le relative mappe dell'applicazione del metodo alla parte terminale del bacino del fiume Adda.

SUMMARY

The application of the methodological approach to evaluate the ecological risk of chemical mixtures in water bodies described in the previous paper is here presented. Chemical data used are those of surface waters obtained from the Italian National Institute for Environmental Protection and Research (Measured Environmental Concentration) for data on environmental contamination by regulated organic substances) or data from scientific publications for the so-called emerging substances (for which, although their widespread presence in the environment has been recognized, the effect concentrations and concentration limits have not yet been established, therefore not yet included in the legislation). The chemical data are georeferenced to a single coordinate system for each monitoring station. In fact, this approach could also be applied to predicted environmental concentrations (PEC, calculated by models). The overall mixture toxicity is then evaluated for three representative aquatic organisms (algae, Daphnia, fish) using the concentration addition model to combine exposure with ecotoxicological data (EC_{50} , LC_{50} , from different databases). A database management system was used to facilitate the creation, organisation, and management of the large datasets. The outputs were obtained as GIS-based mixture risk maps and tables (listing the toxic unit of mixtures and individual substances) useful for further data processing and considerations, such as the identification of priority mixtures (chemical mixtures that are frequently found and have high toxicity unit values). Such elaborations can be useful in order to manage the substances that may cause concern. The method was applied to different Italian watersheds and sampling points, upstream and/or downstream of urban treatment plants, as well as predicted environmental data for agricultural crops and for a wastewater treatment plant.

As an example, the results and the related maps of the application of the method to the terminal part of the Adda river basin are here reported.

* paola.grenni@irsa.cnr.it

L'approccio metodologico descritto nell'articolo precedente, che prevede l'applicazione del modello *Concentration addition* (CA) è stato applicato a diversi casi di studio al fine di identificare miscele prioritarie, cioè miscele che risultino molto frequenti ed abbiano valori di unità di tossicità elevati. Utilizzando il modello proposto e descritto nel precedente articolo, è stato possibile anche confrontare il rischio delle singole sostanze con quello delle miscele; infatti il modello prevede prima il calcolo del rischio delle singole sostanze per i tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce) e poi combina gli effetti di tutte le sostanze presenti nella miscela.

Per i dati ecotossicologici (EC₅₀ o LC₅₀), dei tre livelli trofici considerati, sono stati presi in considerazione i dati di letteratura più recenti e quelli disponibili nel database dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche (*European Chemicals Agency*, ECHA)⁽¹⁾, dalla letteratura scientifica, dai database PPDB (*Pesticides Properties DataBase*, per i fitofarmaci)⁽²⁾, VSDB (*Veterinary Substances Database*)⁽³⁾, ECOTOX⁽⁴⁾ (EPA) e la piattaforma VEGA⁽⁵⁾ dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri.

A livello nazionale sono stati identificati diversi scenari di contaminazione multipla di ecosistemi lotici utilizzati come casi studio per la presenza di miscele.

La selezione degli scenari è stata effettuata a valle di un'approfondita ricerca di dati di monitoraggio, considerando dati di letteratura scientifica nazionale ed internazionale (riferita a casi di studio italiano) e dati forniti direttamente dalle ARPA regionali (Lazio, Puglia, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Veneto e Piemonte); inoltre sono stati raccolti tutti i dati ecotossicologici disponibili in letteratura per poter applicare il modello di *Concentration addition*.

In base all'uniformità di informazioni reperite e completezza di dati misurati di concentrazione di contaminanti (prevalenza di *input* civile, industriale, o agricolo e contaminazione puntiforme o diffusa) e di dati ecotossicologici riferiti agli stessi contaminanti, sono stati selezionati 5 casi studio, comprendenti aste fluviali e dati puntuali, a monte e/o a valle di impianti di trattamento civile.

Di seguito vengono brevemente descritti i 5 casi di studio considerati (Figura 1):

- la parte terminale del bacino del fiume Adda, uno dei principali affluenti del Po, con 18 stazioni di campionamento, in cui prevalgono pressioni antropiche di origine agricola; in questo caso sono stati raccolti dati analitici relativi a tre anni (2015-2017) forniti dall'ARPA Lombardia;
- un tratto del fiume Tevere (da Civiltà Castellana a Roma città), con 8 stazioni (comprese in un tratto del fiume di circa 50 km), con disponibilità

di dati temporali su 3 anni (2015-2017); i dati sono stati forniti dall'ARPA Lazio;

- un punto specifico del fiume Tevere (Scafa) a valle dell'impianto di depurazione di Roma sud. In questo caso i dati considerati sono quelli disponibili in letteratura che comprendono sia contaminanti organici normati che emergenti (Saccà et al., 2019)⁽⁶⁾ su 3 anni (2013-2014-2015) per 5 campionamenti totali effettuati. I dati derivano da un progetto europeo (Microcokit)⁽⁷⁾ di cui l'IRSA-CNR era coordinatore.
- 15 punti specifici del fiume Ledra (Friuli Venezia Giulia), lungo 21 km di asta fluviale, a monte e a valle di impianti di depurazione civile; i dati (2015) sono stati tratti dalla pubblicazione Raitano et al. (2018)⁽⁸⁾.
- 7 punti specifici di tre fiumi (Olona, Seveso e Lambro), a monte e a valle di impianti di depurazione civile della città di Milano. I dati sono tratti dalla pubblicazione Riva et al., (2019)⁽⁹⁾, (2 campionamenti nel 2011).

A valle di una laboriosa attività di raccolta, verifica, organizzazione, omogeneizzazione spaziale e temporale e successiva elaborazione dei dati tramite software appositi (es. SQL server, Microsoft® Excel e Microsoft® Access) è stato possibile ottenere, per ciascun contaminante, le frazioni di unità di tossicità (xTU) per ciascun livello trofico (alga, dafnia, pesce) in ciascuno dei punti georeferenziati, al fine di ottenere tramite il modello CA applicato la potenza di ogni miscela.

Per i casi di studio sopra riportati sono state prodotte un totale di circa 200 mappe tematiche georeferenziate (in ambiente GIS) relative alla potenza delle miscele. In definitiva in ciascuna mappa tematica ad ogni punto di monitoraggio sono stati associati i relativi dati analitici e le TU (unità di tossicità, che rappresenta la potenza della miscela) derivante dall'applicazione del modello di additività di dose/concentrazione. La produzione cartografica, che ha reso possibile la visualizzazione dei risultati elaborati, è stata ottenuta attraverso una metodologia descritta nei paragrafi successivi in dettaglio.

⁽¹⁾ <https://echa.europa.eu/it/information-on-chemicals/cl-inventory-database>

⁽²⁾ <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>

⁽³⁾ <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>

⁽⁴⁾ <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

⁽⁵⁾ <https://www.vega-qsar.eu/>

⁽⁶⁾ Saccà ML, Ferrero VEV, Loos R, Di Lenola M, Tavazzi S, Grenni P, Ademollo N, Patrolecco L, Huggett J, Barra Caracciolo A, Lettieri T, 2019. *Chemical mixtures and fluorescence in situ hybridization analysis of natural microbial community in the Tiber River. Science of the Total Environment*, 673, 7-19

⁽⁷⁾ *Microcokit: Microbial Community-based sequencing analysis linked to anthropogenic pressures: MicroCoKit to address the water quality, FP7-PEOPLE-2012-IAPP - Marie Curie Action: "Industry-Academia Partnerships and Pathways"*

⁽⁸⁾ Raitano G, Goi D, Pieri V, et al. (Eco)toxicological maps: A new risk assessment method integrating traditional and in silico tools and its application in the Ledra River (Italy). *Environ Int.* 2018; 119:275-286. doi:10.1016/j.envint.2018.06.035

⁽⁹⁾ Riva F., Zuccato E., Davoli E., Fattore E., Castiglioni S., 2019. Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy. *J. Hazard. Mater.* 361, 103-110

Come sopra menzionato, sono stati considerati ulteriori 3 casi di studio in cui il modello è stato applicato a dati di monitoraggio ambientale previsti (PECs: *Predicted Environmental Concentrations*). In particolare sono stati considerati:

- due scenari di colture agrarie (mais e melo)
- un impianto di depurazione (depuratore del Passo del Tonale).

Le PEC (nel caso specifico riferite a corpi idrici correlati agli scenari) sono state calcolate attraverso un corposo e dettagliato lavoro di modellistica previsionale ottenendo risultati di dettaglio a scala mensile lungo l'arco dell'anno delle TU delle miscele prioritarie, al fine di dimostrare la grande potenzialità dell'applicazione del modello CA per una corretta gestione del rischio da miscele per gli ecosistemi acquatici.

In tutti i casi di studio, il modello è stato applicato sia a sostanze normate (cioè quelle elencate tra le prioritarie o pericolose prioritarie, previste dalla normativa acque, inclusi anche i pesticidi) sia a sostanze emergenti (quali ad esempio i farmaci).

Nell'applicazione del modello per valutare la tossicità delle miscele, sono stati identificati i potenziali effetti sugli organismi acquatici. Il risultato della valutazione ha permesso di effettuare delle considerazioni sul rischio delle miscele per gli ecosistemi selezionati.

Casi di studio con dati di contaminazione misurati

Come precedentemente accennato, sono stati identificati a livello nazionale 5 scenari di contaminazione multipla di ecosistemi lotici visualizzati in figura 1:

- la parte terminale del bacino del fiume Adda (caso di studio denominato Adda);
- un tratto del fiume Tevere (Tevere);
- un punto specifico del fiume Tevere a valle dell'impianto di depurazione di Roma sud (Scafa);
- un tratto del fiume Ledra (Ledra);
- punti specifici di tre fiumi (Olona, Seveso e Lambro), a monte e a valle di impianti di depurazione civile della città di Milano (Milano).

Selezione dei dati

Nei 5 casi di studio è stata effettuata una selezione dei dati da utilizzare nelle diverse elaborazioni del modello applicato. In una prima selezione, sono stati considerati solo i dati relativi ai contaminanti organici. I contaminanti inorganici (es. metalli) non sono stati considerati nell'elaborazione. Inoltre, non sono stati considerati i gruppi di sostanze (es. Idrocarburi policiclici aromatici, DDD+DDT+DDE, m+p-Xilene, Methylbenzotriazoles ecc.) nell'applicazione del modello di additività di dose/concentrazione perché non esiste un valore unico di ecotossicità. Da questa selezione



Figura 1. Ubicazione dei 5 casi di studio con valori misurati di contaminanti ambientali in acque superficiali nei quali è stato applicato il modello con l'approccio teorico/empirico

Tabella 1. Elenco dei contaminanti considerati ed i relativi dati di ecotossicità (mg/l) per i tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce) utilizzati per l'applicazione del modello additività di dose/concentrazione nei 5 casi di studio con dati di contaminazione misurati

Sostanza	Numero CAS	LC ₅₀ Pesce	EC ₅₀ Dafnia	EC ₅₀ Algae	Caso di studio				
					Adda	Tevere	Ledra	Milano	Scafa
1,1,1-Tricloroetano	71-55-6	94	530	430	X				
1,2,3-Triclorobenzene	87-61-6	0.99	0.46	0.9	X				
1,2,4-Triclorobenzene	120-82-1	0.7	1.4	1.4	X				
1,2-Diclorobenzene	95-50-1	1.52	0.66	2.2	X				
1,3 Diclorobenzene	541-73-1	5.7	1.2	9.2	X				
1,3,5 Triclorobenzene	108-70-3	21	0.45	1.4	X				
1,4 Diclorobenzene	106-46-7	1.12	2.2	1.6	X				
17- α -etinilestradiolo	57-63-6	1.296	0.98	3.67				X	
1H-Benzotriazolo	95-14-7	180	15.8	75			X		X
2,4,5-T (acido 2,4,5-triclorofenossiacetico)	93-76-5	1.3	5	2	X				
2,4-Diclorofenolo	120-83-2	2.63	1.5	3.44	X				
2-Clorofenolo	95-57-8	-	2.6	70	X				
2-idrossiatrazina	2163-68-0	1.5	2	10			X		
2-idrossiterbutilazina	66753-07-9	2.5	2.8	3.8			X		
4-MBC (4-Methylbenzylidene Camphor)	36861-47-9	0.74	0.56	7.66				X	
Acetamiprid	135410-20-7	100	1	98.3	X				
Acido 2,4 diclorofenossi acetico (2,4 D)	94-75-7	100	2.7	24.2	X				X
Acido 2,4 meticlorofenossi acetico (MCPA)	94-74-6	50	0.152	79.8	X				X
Aclonifen	74070-46-5	0.67	0.006	0.47	X				
Alacloro	15972-60-8	1.8	0.01	0.966	X	X			
Aldrin	309-00-2	0.0046	0.028	-	X	X			
Ametrina	834-12-8	5	0.01	0.0036	X				
AMPA (acido aminometilfosfonico)	1066-51-9	38	12	0.64	X				
Antracene	120-12-7	0.00278	0.0012	0.0033	X	X			X
Atrazina	1912-24-9	4.5	0.019	0.059	X	X	X		
Atrazina-desetil	6190-65-4	-	-	0.1	X				
AZIMSULFURON	120162-55-2	154	0.00062	0.011	X				
Bensulfuron Metile	83055-99-6	66	0.0008	0.02	X				
Bentazone	25057-89-0	100	5.4	10.1	X				
Benzene	71-43-2	5.3	10	100	X	X			
Benzil-butyl-ftalato (BBP)	85-68-7	0.51	0.74	0.325	X				
Benzofenone	119-61-9	10	6.784	3.5			X		
Bis(2-metilpropil)ftalato	84-69-5	0.9	4.8	0.56	X				
Bisfenolo A (BPA, 2,2-Bis-(4-idrossifenil)-propano)	80-05-7	4.6	10.2	2.73	X			X	
BP3 (Oxibenzene; 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone)	131-57-7	3.8	1.87	0.67				X	
BP4 (benzofenone-4)	4065-45-6	215	50	109.55				X	
Bromacil	314-40-9	36	119	0.013	X				
Bromopropilato	18181-80-1	0.35	0.17	52	X				
Caffeina	58-08-2	87	182	100				X	
Carbendazim	10605-21-7	0.19	0.15	7.7			X		
Chinossifen	124495-18-7	0.27	1.85	0.027	X				
Clorfenvinfos	470-90-6	1.1	0.00025	1.36	X	X			
Cianazina	21725-46-2	10	0.051	0.2	X				
Cibutrina	28159-98-0	0.86	0.011	0.0023	X				X

Tabella 1. Elenco dei contaminanti (II)

Sostanza	Numero CAS	LC50 Pesce	EC50 Dafnia	EC50 Algae	Caso di studio				
					Adda	Tevere	Ledra	Milano	Scafa
Ciprofloxacina	85721-33-1	100	60	2.97				X	
Clordano Totale	57-74-9	0.09	0.59	-	X				
Cloridazon	1698-60-8	41.3	3.16	3	X				
Clorobenzene (Monoclorobenzene)	108-90-7	4.5	0.59	12.5	X				
Clorpirifos	2921-88-2	0.025	0.0001	0.53	X	X			
Clorpirifos Metile (3,5,6-tricloro-2-piridinolo, tcp)	5598-13-0	0.41	0.0006	0.57	X				
Cloruro di Vinile	75-01-4	210	119	77	X				
Cycloxdim	101205-02-1	220	100	74.9	X	X			
DDD	72-54-8	0.07	0.009	-	X				
DDE	72-55-9	0.032	0.001	-	X				
DDT	50-29-3	2.5	0.005	-	X				
DDT o,p	789-02-6	2.5	-	-	X	X			
DEET - Dietiltoluamide	134-62-3	71.3	75	-			X		X
Di-2-etilesifalato	117-81-7	0.16	0.18	0.003	X	X			
Diazepam	439-14-5	12.6	0.05	-			X	X	
Diazinone	333-41-5	3.1	0.001	6.4	X		X		
Dibenzo(a,h)pirene	189-64-0	-	-	-	X				
Dibromoclorometano	124-48-1	79.3	26.5	9.6	X				
Dibutil-ftalato (DBP)	84-74-2	0.46	0.76	0.75	X				
Dicamba	1918-00-9	100	0.45	1.8	X				
Diclofenac	15307-86-5	5.3	39.9	48.1	X		X	X	X
1,2 Dicloroetano	107-06-2	136	155	100	X	X			
Diclorometano	75-09-2	193	27	-	X	X			
Dicofol	115-32-2	0.51	0.14	0.075	X	X			
Dieldrin	60-57-1	0.0012	0.25	0.1	X	X			
Dietil-Ftalato (DEP)	84-66-2	12	90	45	X				
Dimetil-ftalato (DMP)	131-11-3	39	52	259.8	X				
Dimetoato	60-51-5	30.2	2	90.4	X				
Diuron	330-54-1	6.7	0.0183	0.0027	X	X	X		
EDDP	17109-49-8	0.43	-	-			X		
Endosulfan (isomeri alfa e beta)	115-29-7	0.002	0.44	2.15	X	X			
Endosulfan alfa	959-98-8	0.002	0.44	2.15	X				
Endosulfan beta	33213-65-9	-	-	-	X				
Endosulfan solfato	1031-07-8	0.01	0.76	-	X				
Endrin	72-20-8	0.00073	0.0042	-	X	X			
Eptacloro	76-44-8	0.007	0.042	0.027	X				
Eptacloro epossido	1024-57-3	0.02	0.24	200	X				
Eritromcina	114-07-8	349	30.5	0.02				X	
Esaclorobenzene	118-74-1	0.03	0.5	0.01	X	X			
Esazinone	51235-04-2	320	0.072	0.0145	X				
ETBE (etil terbutil etere)	637-92-3	974	110	1100	X				
Etilbenzene	100-41-4	4.2	1.8	3.6	X				
Fenitroton	122-14-5	1.3	0.0086	1.3	X				
Flufenacet	142459-58-3	2.13	0.002	0.0020 4	X		X		
Fluorene	86-73-7	0.82	0.43	-	X				X

Tabella 1. Elenco dei contaminanti (III)

Sostanza	Numero CAS	LC50 Pesce	EC50 Dafnia	EC50 Algae	Caso di studio				
					Adda	Tevere	Ledra	Milano	Scafa
Glifosato	1071-83-6	38	12	4.4	X				
HCH alfa	319-84-6	0.82	-	10	X				
HCH gamma (lindano)	58-89-9	0.0029	0.027	2.5	X				
Ibuprofene	15687-27-1	173	1.65	39.9			X	X	
Imidacloprid	138261-41-3	83	85	10	X		X		
Isodrin	465-73-6	0.012	1	-	X	X			
Isopropilbenzene	98-82-8	4.8	2.14	2.01	X				
Isoproturon	34123-59-6	18	0.031	0.013	X	X			
Isoxaflutol	141112-29-0	1.7	0.016	0.12	X				
Lincomicina	154-21-2	980	379.4	-			X	X	
Linuron	330-55-2	3.15	0.017	0.016	X		X		
Metalaxyl	57837-19-1	100	85	33	X				
METAMITRON	41394-05-2	190	0.4	0.4	X				
Metiocarb	2032-65-7	0.65	0.008	2.2	X				
Metolaclor	51218-45-2	3.9	0.043	57.1	X		X		X
Metribuzin	21087-64-9	74.6	0.008	0.02	X		X		
Mevinfos	7786-34-7	0.012	0.00016	71	X				
Mirex	2385-85-5	100	0.1	0.1	X				
Molinate	2212-67-1	16	7.7	0.5	X				
MTBE (metil terbutil etere)	1634-04-4	574	187	491	X				
Nicosulfuron	111991-09-4	65.7	0.002	7.8	X	X	X		
Nicotina	54-11-5	3	3	11				X	
ofloxacin	82419-36-1	-	-	4.74				X	
Ortofosfato	14265-44-2	100	100	100	X				
Ossadiazone	19666-30-9	1.2	0.057	0.004	X				
Oxadixyl	77732-09-3	300	530	46	X				
Oxychlordan	27304-13-8	0.002	1.3	-	X				
Oxydemeton-methyl	301-12-2	17	0.11	100	X				
Oxytetracycline	79-57-2	116	102	0.342				X	
p,p'-DDT	50-29-3	2.5	0.005	-	X	X			
Paracetamolo	103-90-2	100	11.85	112.66			X	X	
Para-terz-ottilfenolo (4-(1,1',3,3'-tetrametil)-fenolo)	140-66-9	0.26	0.0133	1.9	X	X		X	
Paration etile	56-38-2	1.5	0.0025	0.5	X				
Paration metile	298-00-0	2.7	0.0073	3	X				
PBSA	27503-81-7	-	-	100				X	
Penconazolo	66246-88-6	1.3	6.75	4.9			X		
Pendimetalin	40487-42-1	0.138	0.012	0.006	X				
Pentaclorobenzene	608-93-5	0.19	5.3	6.6	X	X			
Pentaclorofenolo	87-86-5	0.17	0.12	0.08	X	X			
PFBS (Perfluoro Butane Sulfonate)	375-73-5	-	1.937	5.733	X				X
Piperonyl-butoxide	51-03-6	3.94	0.51	1.69			X		
Pirimicarb	23103-98-2	100	0.017	140	X				
Pretilachlor	51218-49-6	0.9	13	9.29	X				
Prometrina	7287-19-6	5.5	0.0105	0.002	X				
Propanil	709-98-8	5.4	5.8	0.11	X				
Propazina	139-40-2	17.5	0.88	0.18	X				

Tabella 1. Elenco dei contaminanti (IV)

Sostanza	Numero CAS	LC50 Pesce	EC50 Dafnia	EC50 Algae	Caso di studio				
					Adda	Tevere	Ledra	Milano	Scafa
Protoate	2275-18-5	20	-	-	X				
Quinclorac	84087-01-4	100	0.5	6.53	X				
Rimsulfuron	122931-48-0	390	0.009	1.2	X				
Simazina	122-34-9	90	0.3	0.04	X	X			
Stirene	100-42-5	4.02	4.7	4.9	X				
SULCOTRIONE	99105-77-8	227	0.051	1.2	X				
Tamoxifen	10540-29-1	-	0.21	0.47				X	
Terbutilazina	5915-41-3	2.2	0.0128	0.012	X		X		X
Terbutilazina desetil	30125-63-4	18	42	0.14	X		X		
Terbutrina	886-50-0	1.1	2.66	0.0024	X				X
Tetracloroetilene	127-18-4	5	8.5	3.64	X	X			
Tetracloruro di carbonio	56-23-5	43	29	0.217	X	X			
Tetraclorvinfos	22248-79-9	0.43	0.002	-	X				
Tetradifon	116-29-0	880	2	100	X				
Tiaclopid	111988-49-9	24.5	95.4	60.6	X	X			
Thiobencarb	28249-77-6	0.98	0.99	0.017	X				
Thiophanate-methyl	23564-05-8	11	5.4	4.7			X		
Toluene	108-88-3	5.5	3.78	134	X				
Tribromometano	75-25-2	193	27	-	X				
Triclocarban	101-20-2	0.085	0.0055	0.0344				X	
Tricloroetilene	79-01-6	28.3	20.8	36.5	X	X			
Triclorometano	67-66-3	1.24	29	13.3	X	X			
Triclosan	3380-34-5	0.54	0.191	0.0007				X	
Trifluralin	1582-09-8	0.088	0.0435	0.0122	X	X			
Xilene (somma isomeri)	1330-20-7	2.6	1	1.3	X				
Xilene orto	95-47-6	2.6	1	2.6	X				

sono alla fine risultate 249 sostanze per le quali sono stati ricercati i dati di ecotossicità nei database ECHA, PPDB o da altre fonti ufficiali (es. OSPAR). Sono risultate 168 sostanze con almeno un dato di ecotossicità (Alga, Dafnia o pesce) e le restanti 81 sostanze non hanno un dato ufficiale di ecotossicità. In Tabella 1 si riporta l'elenco dei contaminanti considerati ed i relativi dati di ecotossicità (espressi in mg/L) per i tre livelli trofici (alga, dafnia e pesce) che sono stati utilizzati per l'applicazione del modello additività di dose/concentrazione.

Si vuole evidenziare che nei siti ufficiali sopra menzionati i dati di ecotossicità delle singole sostanze (EC₅₀ o LC₅₀), non sono sempre completi e in alcuni casi sono riportati per un solo organismo, in altri casi per due e, nella maggior parte dei casi, per tutti e tre gli organismi considerati (alga, dafnia, pesce). Inoltre, in alcuni casi di studio, il numero di punti di campionamento nel corso del tempo nonché le sostanze monitorate nei diversi punti temporali non è risultato omogeneo e in tali casi sono state effettuate delle aggre-

gazioni temporali (vedi il bacino dell'Adda o del Tevere in cui ad esempio sono stati considerati i dati di monitoraggio nel corso di uno o due mesi consecutivi).

Il valore aggiunto di questo studio è stato quello di applicare il modello CA ad un'ampia casistica a livello del territorio italiano e la successiva produzione di mappe tematiche. Queste ultime hanno il grande vantaggio non solo di evidenziare i risultati ottenuti in modo chiaro e visibile, ma grazie alla possibilità di ottenere *output* diversi a seconda del tipo di elaborazione effettuata (es. considerazione dei fattori di sicurezza, dei valori di LOQ, ecc.), di ottenere diversi tipi di "rischio" (es. *Best case/Worst case*) e di individuare le sostanze che maggiormente contribuiscono alla potenza della miscela.

Best case/Worst case (caso migliore/caso peggiore)

Una considerazione importante di cui tenere conto è quella delle concentrazioni di monitoraggio e del loro

limite di quantificazione strumentale. In molti casi di studio i risultati delle analisi (concentrazione rilevata) avevano un valore minore del limite di quantificazione (<LOQ). Il limite di quantificazione rappresenta il limite di concentrazione fino al quale è possibile ottenere una misura per lo strumento utilizzato e/o per la metodica applicata, con relativa incertezza. In teoria, una concentrazione <LOQ potrebbe non significare assenza della sostanza, ma semplicemente che il metodo applicato o la strumentazione utilizzata non rilevano una determinata sostanza al di sotto di una certa concentrazione. Tale limitazione può dar luogo ad ulteriore incertezza nella valutazione della tossicità della miscela.

Per tale motivo si è deciso di effettuare una doppia elaborazione e il modello di additività di dose/concentrazione è stato applicato con due criteri:

- Criterio *Best case*, in cui si è considerato il valore <LOQ =0, e dunque, quella determinata sostanza non è stata considerata facente parte della miscela.
- Criterio *Worst case*, ogni sostanza con un valore di concentrazione <LOQ, è stata comunque considerata nella miscela con una concentrazione pari a metà del LOQ (come da Linee Guida TGD) ed inclusa nell'elaborazione della tossicità della miscela. È indubbio che questo tipo di elaborazione è molto peggiorativa rispetto alla reale situazione.

Come si potrà vedere nelle mappe tematiche, vengono riportati entrambe le elaborazioni di *Best case* e *Worst case*.

Fattori di sicurezza (Assessment factors)

Un'ulteriore considerazione è stata fatta per il "grado di incertezza" dato dall'elaborazione del modello applicato. Infatti il modello considera i dati di ecotossicità per i tre organismi *target* (alga, dafnia, pesce). Questi ultimi potrebbero anche non essere sempre quelli più sensibili alle singole sostanze considerate, sebbene siano appartenenti a tre livelli trofici differenti e rappresentativi dell'ambiente acquatico. Per superare tale "incertezza", come comunemente previsto dalle linee guida ECHA inerenti al rischio ecotossicologico delle sostanze chimiche, è stato anche applicato un *assessment factor* di 0,1 per i dati elaborati di tossicità della miscela riguardanti alghe e di 0,01 per dafnia e pesci.

Come si potrà vedere di seguito, per ciascun caso di studio riguardante i dati di monitoraggio, sono state prodotte anche mappe tematiche in cui al risultato dell'elaborazione modellistica è stato applicato l'*assessment factor* (sia per i casi di *Best case* che per quelli di *Worst case*).

Identificazione dell'influenza delle diverse sostanze nella potenza della miscela

Una ulteriore elaborazione dei dati è stata effettuata per identificare, all'interno di tutte le miscele considerate e per ciascun livello trofico, l'influenza di ciascuna sostanza chimica sulla potenza della miscela, in termini di percentuale. Tale elaborazione è fondamentale per identificare quelle sostanze la cui immissi-

sione nell'ambiente va eventualmente gestita.

In definitiva, dunque, per ciascun caso, le mappe tematiche georeferenziate prodotte per i casi di studio relativi ai dati misurati sono state:

- tre diverse mappe, ciascuna per ogni organismo *target* (alga, dafnia o pesce) per ciascun punto o area di monitoraggio e tempo di campionamento;
- mappe per i tre organismi sia per il criterio di *Best case* (considerando solo le sostanze rilevate a concentrazione >LOQ) sia per il criterio *Worst case*;
- ulteriori mappe sono state prodotte per ciascuna punto o area di campionamento, per ciascun tempo di campionamento, per organismo *target* e nei due criteri, applicando gli *assessment factor*.
- mappe che riportano la % di tossicità di ciascuna sostanza all'interno della miscela, sempre considerando ciascun organismo *target*, punto o area di monitoraggio e tempo di campionamento (i cui dati sono riportati nelle tabelle corrispondenti).

La possibilità di individuare miscele prioritarie e le sostanze che maggiormente governano la loro tossicità è l'aspetto chiave per possibili interventi di approfondimento delle analisi (es. test ecotossicologici sulla matrice acquosa) ed eventuali interventi mitigazione del rischio delle sostanze più pericolose.

In definitiva, per ogni sito/area di monitoraggio sono state prodotte per ciascun tempo di campionamento diverse mappe per un totale di 207 mappe tematiche georeferenziate.

Metodologia di elaborazione dati e produzione di cartografia tematica in ambiente GIS

La metodologia di elaborazione delle mappe tematiche che esprimono la potenza delle miscele e il contributo della singola sostanza a tale potenza si è articolata in tre parti distinte, successivamente integrate tra loro:

- Definizione del contesto geografico di riferimento;
- Elaborazione dei dati analitici;
- Produzione di cartografia tematica in ambiente GIS.

La fase preliminare della definizione del contesto geografico di riferimento ha riguardato la preparazione di mappe di base omogenee per la caratterizzazione geografica dei casi di studio, per ognuno dei quali si è provveduto a georeferenziare le stazioni di misura e altri elementi ritenuti utili (impianti di trattamento, ecc). Una panoramica delle mappe di base relative a ciascun caso di studio è rappresentata in Figura 2. Le mappe di base sono state realizzate in ambito GIS (*Geographic Information System*) utilizzando il software ArcGIS (ESRI)⁽¹⁰⁾. Ogni carta è stata corredata di

⁽¹⁰⁾ Pacchetto ArcGIS della ESRI (*Environmental System Research Institute*), per la gestione di dati territoriali e produzione di mappe, visualizzazione, interrogazione, analisi spaziale e distribuzione di dati geografici. <https://www.esriitalia.it/prodotti/la-nostra-offerta/piattaforma-esri/arcgis-10-5>



Figura 2. Localizzazione dei 5 casi di studio con dati di contaminazione misurati e relative mappe di base

livelli informativi necessari per l'analisi in esame quali l'estensione del bacino/i idrografico di riferimento ed il reticolo idrografico, in forma semplificata, per la cui visualizzazione è stata assegnata una adeguata simbologia. I livelli informativi relativi alle caratteristiche fisiche del territorio sono stati scaricati dal portale cartografico Sinanet di ISPRA (<http://www.mais.sinanet.isprambiente.it/>) e successivamente elaborati utilizzando alcune funzionalità di *Geoprocessing* per il corretto inquadramento dell'area di studio, mentre come *basemap* è stata utilizzata una tra quelle disponibili in ArcGIS, in particolare la *World Topographic Map*.⁽¹¹⁾

I dati amministrativi sono stati scaricati dal sito ISTAT (<https://www.istat.it/>).

Il primo step che si è dovuto effettuare, che in alcuni casi è stato altamente *time consuming*, ha riguardato l'omogeneizzazione delle mappe; infatti i dati di partenza di ciascun caso di studio non erano uniformi (mappe da pubblicazioni internazionali o dati di contaminazione associati a punti di campionamento con coordinate geografiche). Per esempio, per quanto riguarda le stazioni di monitoraggio, in alcuni casi la disponibilità delle coordinate (dati ARPA) ha reso il processo di georeferenziazione piuttosto speditivo, ma in altri casi la base di partenza era costituita solo una mappa presente come figura nella pubblicazione di riferimento, priva non solo delle coordinate delle stazioni, ma anche di riferimenti geografici precisi; in quest'ultimo caso il processo di georeferenziazione è stato più laborioso.

Dal punto di vista operativo, per la realizzazione delle mappe georeferenziate di base per ciascun caso di studio è stato creato un progetto (file con estensione .mxd) in ArcMap, che è una delle applicazioni principali di ArcGIS. I dati sono stati archiviati in geodatabase (di tipo File Geodatabase, formato GDB, che è il formato proprietario maggiormente utilizzato in ArcGIS); per garantire una gestione ottimale dei dati si è deciso di realizzare uno o più geodatabase per ogni caso di studio. Il posizionamento delle stazioni di monitoraggio e degli altri elementi puntuali utili (depuratori, impianti di trattamento ecc.) per l'inquadramento del caso di studio è stato realizzato seguendo due procedure diverse a seconda della disponibilità delle coordinate:

- in presenza di coordinate, le stazioni di monitoraggio sono state posizionate in carta mediante l'utilizzo della funzionalità "*Create feature from XY table*", che consente di creare un dato geografico vettoriale (più specificatamente una *Feature Class* puntuale all'interno di un Geodatabase) a partire da una tabella (in formato excel in questo caso, ma anche in formato testo, oppure una tabella all'interno di un geodatabase) che contenga due campi con le coordinate XY;
- in assenza di coordinate, mediante l'utilizzo delle funzioni di *Editing* disponibili in ArcMap; in parti-

colare si è provveduto a creare una nuova *Feature Class* di tipo puntuale vuota all'interno di un geodatabase e i punti relativi alle stazioni di monitoraggio sono stati inseriti manualmente direttamente sulla mappa, con l'aiuto di *basemap* utili per inquadrare il contesto geografico.

Il sistema di riferimento scelto per il progetto di ArcMap relativi ad ogni caso di studio è WGS 84 UTM32N⁽¹²⁾.

Il modello di additività dose/concentrazione è stato applicato a dati di monitoraggio di sostanze chimiche normate ed emergenti che derivano da fonti di letteratura scientifica, in particolare nel caso dei contaminanti emergenti, e da campagne di monitoraggio effettuate dalle ARPA nell'ambito della Direttiva 2000/60/CE ("*Water Framework Directive*").

Come già menzionato, la metodologia calcola la tossicità della miscela esprimendola in termini di unità di tossicità (TU, *Toxic Unit*), identificata come la sommatoria dei rapporti tra la concentrazione misurata della singola sostanza per il corrispondente *endpoint* tossicologico; inoltre, il calcolo è riferito ad un singolo momento e un singolo luogo di campionamento (caratterizzazione spazio-temporale). È importante sottolineare questi aspetti perché la mole di dati da gestire può incrementare notevolmente a seconda sia dell'ampiezza del territorio da analizzare che del numero di anni di monitoraggio considerati.

Al fine di agevolare l'applicazione del modello anche in contesti territorialmente e temporalmente ampi, è stata implementata una procedura semi-automatica di gestione dei dati e di calcolo dei valori di TU che prevede l'utilizzo di sistemi informatici di media complessità: SQL server come base dati relazionale (anche nella versione gratuita Express Edition), Microsoft® Excel e Microsoft® Access.

In Figura 3 è riportato il flusso di lavoro. Stabilita l'area di interesse, si procede con l'acquisizione dei dati dalle ARPA interessate. L'insieme delle informazioni deve passare attraverso un processo di verifica e omogeneizzazione spaziale (nel caso di dati acquisiti da diverse ARPA) e temporale (in caso di variazioni di formato).

In questa fase è necessario inoltre elaborare le informazioni relative alla concentrazione misurata quando il valore riscontrato è inferiore al LOQ. Seguendo la metodologia proposta, tutte le misure inferiori a LOQ devono essere sostituite con il valore $[LOQ/2]$, utilizzato poi in fase di calcolo nel cosiddetto "*Worst case*".

I dati elaborati vengono poi inseriti in una base dati relazionale utilizzando un semplice modello dati (Figura 3) che contempla una tabella dei dati di monitoraggio complessivi e una tabella degli *endpoint* tossicologici. La prima ("*Dati stazioni*" nella Figura 4) deve includere obbligatoriamente le informazioni relative a:

(11) Sources: Esri, HERE, Garmin, Intermap, increment P Corp., GEBCO, USGS, FAO, NPS, NRCAN, GeoBase, IGN, Kadaster NL, Ordnance Survey, Esri Japan, METI, Esri China (Hong Kong), (c) OpenStreetMap contributors, and the GIS User Community

(12) Pacchetto WGS84: sistema cartesiano con asse z coincidente con l'asse di rotazione convenzionale terrestre, con un'ellissoide associata. È il sistema di riferimento utilizzato dal sistema GPS. UTM32N: rappresentazione UTM (zona 33N)

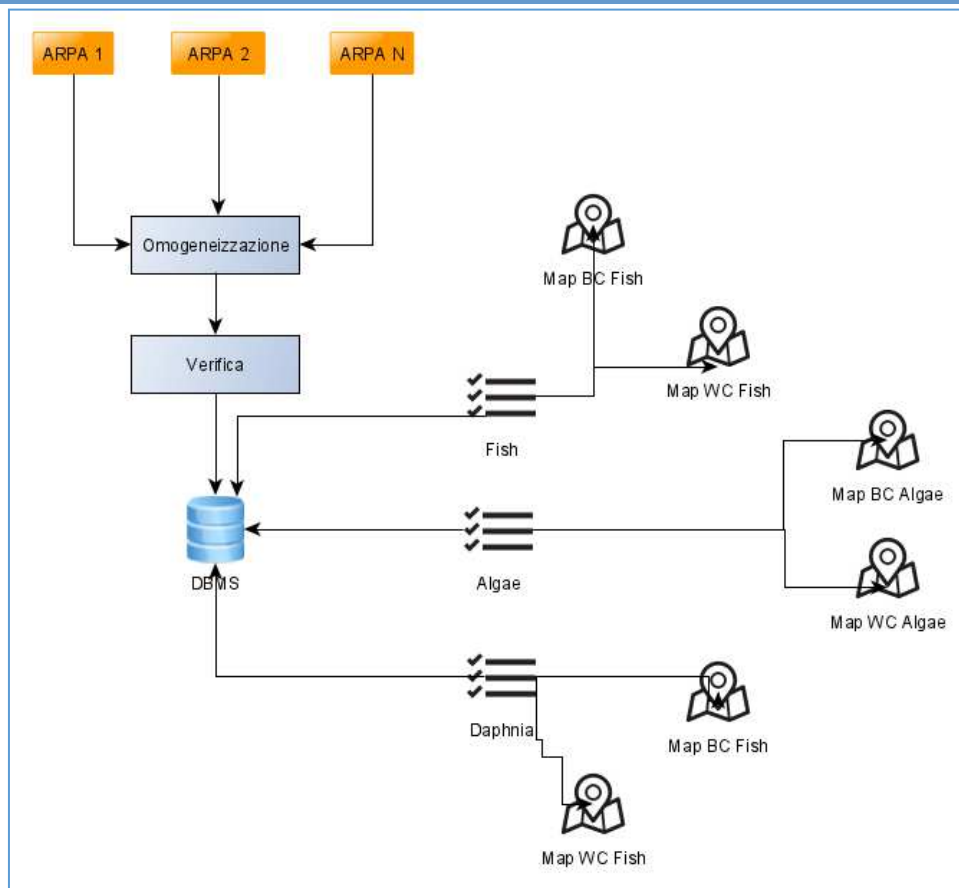


Figura 3. Schema concettuale delle operazioni

- identificativo stazione;
- coordinate geografiche stazione;
- data di campionamento;
- sostanza campionata;
- valore misurato o [LOQ/2] (in una unità di misura).

Altre informazioni di contorno (comune dove si trova la stazione, bacino idrografico, asta o corso idrico) possono essere utili per una facile lettura dei dati, ma non sono necessari ai successivi calcoli.

La tabella degli *endpoint* tossicologici (“Sostanze” nello schema riportato nella Figura 4) contiene i dati degli *endpoint* tossicologici per le sostanze di interesse.

I dati possono essere acquisiti da basi dati esterne come ad esempio il *Pesticide Properties DataBase*⁽¹³⁾ o da fonti di letteratura scientifica.

La base dati contiene poi una serie di viste⁽¹⁴⁾ (in giallo nel modello dati della Figura 4) che estraggono le

informazioni dalle due tabelle principali e effettuano i calcoli previsti dalla metodologia sviluppata. Una vista è relativa ad un particolare organismo *target*.

In particolare, sono estratti o calcolati i seguenti campi:

- l’identificativo della stazione;
- le coordinate geografiche della stazione;
- la data di campionamento;
- la TU calcolata nel “best case”, escludendo quindi le sostanze i cui valori sono al di sotto del LOQ;
- il numero di sostanze considerate nel calcolo della TU “best case”;
- l’elenco delle sostanze considerate nel calcolo della TU “best case”;
- l’elenco delle sostanze che, pur avendo valori sopra LOQ, non è stato possibile considerare per assenza di *endpoint* tossicologici associati;
- la TU calcolata nel “worst case”, includendo quindi le sostanze i cui valori sono al di sotto del LOQ e considerando come valore [LOQ/2];
- numero di sostanze considerate nel calcolo della TU “worst case”;
- l’elenco delle sostanze considerate nel calcolo della TU “worst case”.

Nelle tabelle 2 e 3 viene riportato un esempio di quanto sopra menzionato.

⁽¹³⁾ Kathleen A. Lewis, John Tzilivakis, Douglas J. Warner & Andrew Green (2016) An international database for pesticide risk assessments and management, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22:4, 1050-1064, DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242

⁽¹⁴⁾ Le viste sono “modi di vedere i dati”. Una vista è rappresentata da una query (SELECT), il cui risultato può essere utilizzato come se fosse una tabella

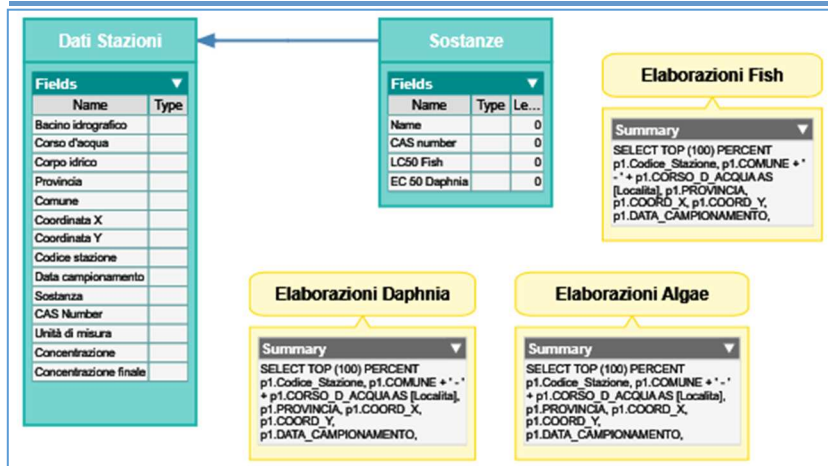


Figura 4. Modello dei dati

I dati estratti attraverso ogni vista possono poi essere agevolmente esportati in un foglio di calcolo per ulteriori elaborazioni e per costituire la base dati di partenza per la visualizzazione cartografica.

Metodologia di elaborazione dati e produzione di cartografia tematica in ambiente GIS

Dal processo di elaborazione dati descritto nel paragrafo precedente sono restituite tabelle di output in formato excel o csv che costituiscono la base per la realizzazione della cartografia tematica relativa a:

- potenza della miscela;
- contributo della singola sostanza alla potenza della miscela.

Tali tabelle di output dell'elaborazione dei dati analitici hanno un formato e una struttura appropriata per essere importate in ambito GIS e quindi per essere integrate con i layer delle stazioni di monitoraggio a cui si riferiscono; un esempio è rappresentato in Tabella 4.

In Tabella 4 a) è riportato un esempio di output del processo di analisi dei dati che rappresenta la potenza della miscela espressa in termini di Unità di Tossicità (TU) mentre in b) è riportata la frazione di Unità di Tossicità, cioè il contributo espresso in percentuale di ogni sostanza alla potenza della miscela.

Come già trattato ampiamente nei paragrafi precedenti, la TU è data dalla sommatoria delle frazioni di unità di tossicità ($TU = \sum xTU$), dove la frazione di unità di tossicità è espressa dal rapporto tra la concentrazione misurata della sostanza ed il dato tossicologico (xTU : MEC/L(E)C₅₀) relativo ai tre livelli trofici considerati (pesce, dafnia, alga).

Le tabelle di output sono state strutturate in modo adeguato per essere inserite in ambito GIS utilizzando una funzionalità denominata JOIN (Figure 5 e 6) che consente di mettere in relazione la tabella degli attributi di un dato vettoriale (in questo caso le Stazioni di monitoraggio) con una tabella esterna. Tale operazione fornisce come output una tabella unica virtuale che consente di attribuire una simbologia al dato vettoriale sulla base delle informazioni contenute in tabella. Dal punto di vista tecnico è opportuno specificare che ogni dato vettoriale è costituito da elementi geografici dello stesso tipo (poligoni, linee, punti) a

cui è associata una tabella degli attributi (TA) che contiene le informazioni. Solitamente la tabella degli attributi è piuttosto scarna e contiene informazioni minimali che non variano, ma che possono essere

Tabella 2. Esempio dei campi utilizzati per le elaborazioni.

Campo	Esempio
Identificativo stazione	0013311ir_1
Località	Acquanegra Cremonese - Riglio (Roggia)
Provincia	
Coordinata X (WGS 84 - UTM 32N)	569644
Coordinata Y (WGS 84 - UTM 32N)	5000750
Data di campionamento	10/08/2015
Sostanze scartate per assenza di endpoint tossicologici	Cloruri, Ortofosfato
TU «Best case»	0.008575281
Numero sostanze TU «Best case»	3
Elenco sostanze TU «Best case»	Metolachlor, Terbutilazina, Terbutilazina desetil
TU «Worst case»	0.017830407
Numero sostanze TU «Worst case»	20
Elenco sostanze TU «Worst case»	Alachlor, Atrazina, Clorpirifos, Clorpirifos metile, Dieldrin, Endosulfan (isomeri alfa e beta), Eptacloro, Esaclorobenzene, HCH alfa, HCH gamma (lindano), Meolachlor, Molinate, Oxadiazon, paration etile, Pendimetalin, Pentaclorobenzene, Simazina, Terbutilazina, Terbutilazina desetil, Trifluralin

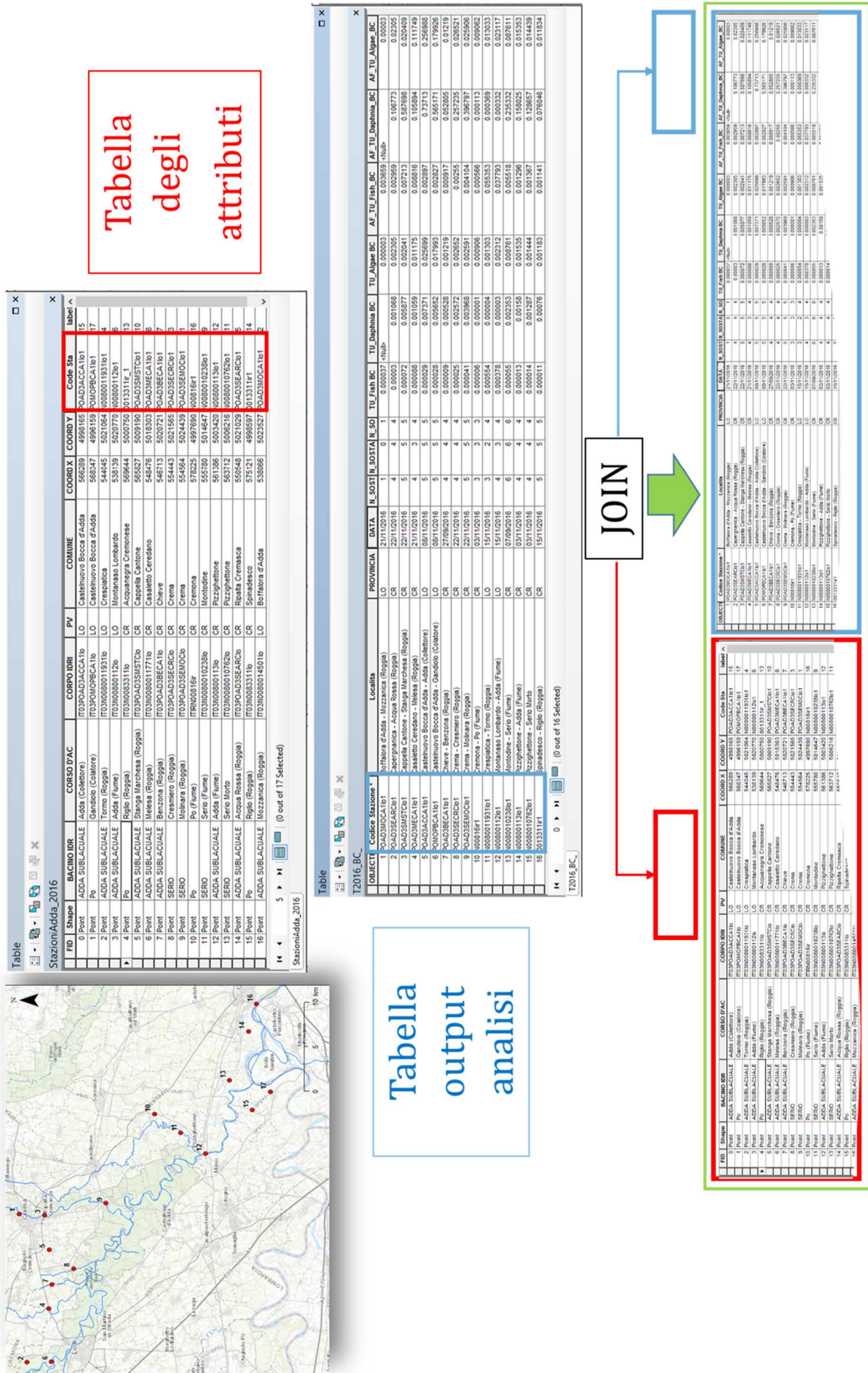


Figura 5. Join tra tabella degli attributi e tabella output del processo di analisi

Tabella 3. Esempio di voci per ogni stazione di campionamento, per ciascuna data di monitoraggio. Codice Stazione: POAD3ACCA1lo1, Data: 10/04/2016, TU Best Case: 1.41E-03

Codice_Stazione	Data campion.	Sostanza	Concentrazione	End-Point	TU fraction
POAD3ACCA1lo1	14/04/2016	Terbutilazina	2.75	2200	1.25E-03
POAD3ACCA1lo1	14/04/2016	Flufenacet	0.2	2130	9.39E-05
POAD3ACCA1lo1	14/04/2016	Metolaclor	0.26	3900	6.67E-05
POAD3ACCA1lo1	14/04/2016	Terbutilazina desetil	0.06	18000	3.33E-06
POAD3ACCA1lo1	14/04/2016	Simazina	0.02	90000	2.22E-07

messe in relazione con tabelle esterne. Nelle figura 5 e 6 è illustrato il processo di funzionamento del join, di seguito spiegato in dettaglio.

La tabella degli attributi del dato vettoriale puntuale che rappresenta le stazioni di monitoraggio contiene poche informazioni essenziali e invariante, quali il codice della stazione, il nome, il corpo idrico di riferimento, la collocazione geografica (provincia, comune di appartenenza) e altre informazioni ritenute utili (per esempio se la stazione è attiva o inattiva ecc); le coordinate possono essere esplicitate, ma in realtà esse sono contenute nel campo denominato *Shape* che è presente di *default* in tutti i dati vettoriali. Un campo molto importante è quello contenente il codice della stazione: è infatti indispensabile che ogni stazione sia identificabile mediante un codice univoco che rappresenta l'elemento di collegamento con la tabella *standalone*. Si definisce in questo contesto *standalone* una qualsiasi tabella che non sia collegata ad elementi geografici. In questo caso le tabelle *standalone* sono quelle che derivano dalla metodologia di analisi descritta nel paragrafo precedente e che contengono i dati di unità di tossicità e di frazione di unità di tossicità che saranno cartografati. I formati delle tabelle *standalone* possono essere vari, ad esempio xls, csv, dbg o anche txt, ma per uniformità e per una gestione ottimale dei dati si è deciso di esportare le tabelle in formato geodatabase; quindi per ogni caso di studio è stato creato un Geodatabase (tra i formati proprietari di ArcGIS si è scelto di utilizzare il File geodatabase, che risulta adatto allo scopo) in cui sono stati archiviati sia il dato vettoriale relativo alle stazioni di monitoraggio che le numerose tabelle *standalone* derivanti dal processo di analisi e che prendono in considerazione per ogni campagna e per ogni livello trofico considerato i vari casi possibili precedentemente descritti: *Best Case*, *Worst Case*, senza o con *Assessment Factor*. Tali informazioni costituiscono la base per la rappresentazione cartografica sia dell'unità di tossicità relativa ad ogni stazione e ad ogni campagna e sia del contributo di ogni sostanza alla potenza della miscela; per quest'ultimo caso l'applicazione del join ha richiesto un'attenzione aggiuntiva che verrà in seguito descritta.

La tabella *standalone* standard (tra le tante realizzate) contiene molti dati che in generale variano nel tempo perché si riferiscono a specifiche campagne di monitoraggio ed in particolare è provvista di un campo fondamentale che contiene i codici delle stazioni nel medesimo formato di quelli contenuti nel campo corrispondente della tabella degli attributi; tale campo, chiamato "chiave" consente l'associazione con la

tabella degli attributi. Come descritto in Figura 5 la funzionalità del join mette in relazione uno specifico campo della tabella degli attributi con il corrispondente nella tabella *standalone* e tramite questi integra le informazioni contenute nella tabella *standalone* con quelle contenute nella tabella degli attributi. Il join può essere applicato solo nel caso in cui la relazione dei valori contenuti nel campo chiave sia di tipo uno-a-uno (cioè ogni riga della tabella degli attributi si riferisce ad una stazione di monitoraggio e viene in messa in relazione in modo univoco con una sola riga della tabella *standalone* che si riferisce alla stessa stazione).

Sulla base di quanto detto, una criticità si è presentata con l'associazione della tabella relativa alle frazioni di unità di tossicità, poiché in questo caso la relazione esistente tra tabella degli attributi e tabella *standalone* è tipo uno-a-molti, cioè ad ogni stazione corrispondono varie sostanze afferenti a quella stazione,

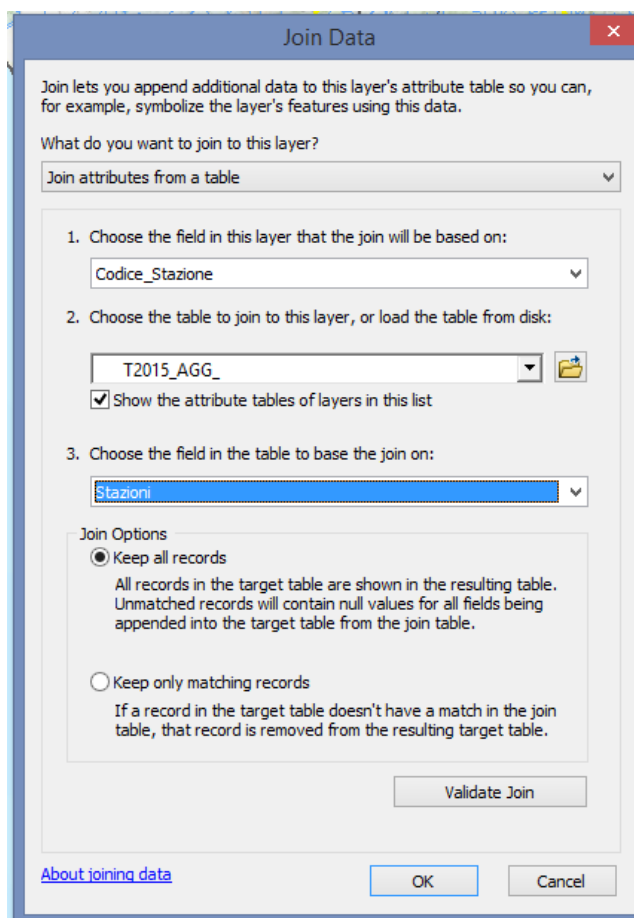


Figura 6. Interfaccia di JOIN in ArcGIS

Stazioni	Data	numSosta	num_xTU	num_xTU	num_xTU	Σ(xTU_Fish)	Σ(xTU_Daphnia)	Σ(xTU_Algae)	TIPO
IT12-F3_76	Ottobre2015	33	26	26	20	0.010310861	0.046342312	0.008235401	WC
IT12-F4_05	Ottobre2015	36	27	26	21	0.046887776	0.083645716	0.028683317	WC
IT12-F4_06	Ottobre2015	36	27	26	21	0.046887776	0.083645716	0.028683317	WC
IT12-F4_07	Ottobre2015	36	26	27	21	0.046887776	0.083645716	0.028683317	WC
IT12-F4_08	Ottobre2015	36	26	26	20	0.046887776	0.083645716	0.028683317	WC
IT12-F5_26	Ottobre2015	38	28	29	22	0.019008718	0.086481229	0.02794096	WC
IT12-F5_27	Ottobre2015	38	29	28	22	0.019008718	0.086481229	0.02794096	WC

A

Stazioni	Data	4-nonylphenol	1,2-Dichloro	Hexachlor	Endosulfan	Trichlorob	Anthracen	Simazine	tetrachlor	Para-tert	Trifluralin	Alachlor	Atrazine	Ber	CASO	TIPO
IT12-F3_76	Ottobre2015	0.161641854	0.035656	0.808209	0	34.88673	0.000269	0.048493	0.18651	0.275526	0.01347	0.005388	0.440841421	WC	Fish	
IT12-F4_05	Ottobre2015	0	0.003921	0.177729	5.33188	1.917942	0.000592	0.021328	0	0.121179	0.005924	0.011849	0.484716377	WC	Fish	
IT12-F4_06	Ottobre2015	0	0.003921	0.177729	5.33188	1.917942	0.000592	0.021328	0	0.121179	0.005924	0.011849	0.484716377	WC	Fish	
IT12-F4_07	Ottobre2015	0	0.003921	0.177729	5.33188	1.917942	0.000592	0.021328	0	0.121179	0.005924	0.011849	0.484716377	WC	Fish	
IT12-F4_08	Ottobre2015	0	0.003921	0.177729	5.33188	1.917942	0.000592	0.021328	0	0.121179	0.005924	0.011849	0.484716377	WC	Fish	
IT12-F5_26	Ottobre2015	0.876790661	0.029011	4.383953	13.15186	9.46177	0.000292	0.289341	1.011682	0.298906	0.014613	0.005845	0.239124726	WC	Fish	
IT12-F5_27	Ottobre2015	0.876790661	0.029011	4.383953	13.15186	9.46177	0.000292	0.289341	1.011682	0.298906	0.014613	0.005845	0.239124726	WC	Fish	

B

Tabella 4.

A) esempio di output del processo di analisi dei dati che rappresenta la potenza della miscela espressa in termini di unità di tossicità (tu).

B) frazione di unità di tossicità espressa in percentuali di ogni sostanza alla potenza della miscela.

che non è gestibile mediante il join. Per risolvere tale criticità, la tabella *standalone* è stata trasposta, per cui le sostanze non sono più espresse come righe ma come colonne afferenti alla stazione di monitoraggio, ripristinando la relazione tra tabelle di tipo uno-a-uno, gestibile dal join.

Il processo di join genera come *output* un'unica tabella virtuale (fig. 7) che integra le informazioni della tabella degli attributi a quelle della tabella *standalone*, che in sostanza significa associare a quest'ultima gli elementi geografici (in questo caso le stazioni di monitoraggio) a cui nello step successivo sarà attribuita una appropriata simbologia. La tabella risultante dal processo di join è detta virtuale poiché in realtà le due tabelle sono ancora divise, ma nell'ambiente ArcMap di ArcGIS in cui le mappe sono state prodotte vengono visualizzate come se fosse una sola, come è adeguato per consentire la visualizzazione cartografica della TU.

In accordo con l'utilizzo del modello di additività come modello di base per valutare la tossicità della miscela, la fase successiva è consistita nella produzione delle mappe tematiche di due tipi:

- 1) Mappe di potenza della miscela (TU: unità di tossicità)
- 2) Mappe del contributo di ogni sostanza alla potenza della miscela (frazione di tossicità xTU espressa in percentuale).

Mappe di potenza della miscela (TU)

Per ogni caso di studio le mappe di unità di tossicità sono state realizzate tenendo in considerazione i seguenti parametri:

- Stazioni di monitoraggio
- Campagna di monitoraggio
- Tre livelli trofici (alga, dafnia, pesce)
- Best case
- Worst case
- Senza Assessment Factor
- Con Assessment Factor (alga: TU/0,1; pesce e dafnia: TU/0,01).

Ogni singola stazione relativamente ad ogni singola campagna di monitoraggio è stata cartografata con una simbologia che ne esprimesse il valore dell'unità di tossicità. Per uniformità e per rendere confrontabili le varie mappe prodotte, è stata elaborata una unica legenda che fosse appropriata e applicabile a tutte le mappe, come indicato in Figura 8.

Le mappe sono state aggregate in modo logico in layout (*template*) e corredate con elementi quali scala grafica, indicazione del Nord, testi, *location map* che le rendessero complete e pronte per la stampa. Le mappe prodotte sono riportate nei singoli casi di studio.

Mappe del contributo di ogni sostanza alla potenza della miscela

La seconda tipologia di mappe prodotta riguarda la

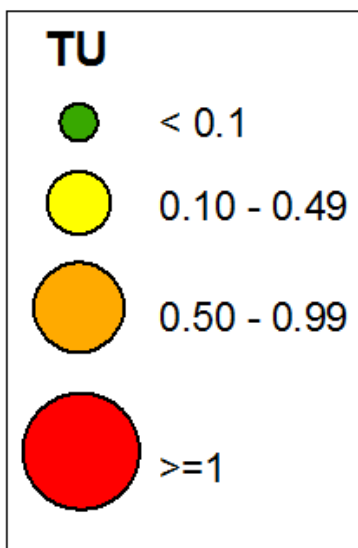


Figura 8. Legenda comune elaborata per rappresentare la TU relativamente a tutti i casi di studio

visualizzazione del contributo delle singole sostanze alla potenza della miscela. In questo caso la rappresentazione cartografica richiede una simbologia diversa dalla precedente, poiché per ogni stazione di monitoraggio è necessario considerare molteplici dati, costituiti dalla percentuale della frazione di tossicità che caratterizza ogni singola sostanza. Quindi per ogni stazione di monitoraggio (elemento georiferito) è necessario visualizzare contemporaneamente molte informazioni; tra le varie disponibili in ArcGIS la simbologia scelta per la visualizzazione della xTU espressa in percentuale è illustrata in Figura 9.

Le mappe sono state aggregate in modo logico in layout (*template*) e corredate con elementi quali scala grafica, indicazione del Nord, testi, *location map* che le rendessero complete e pronte per la stampa. Le mappe prodotte sono riportate nei singoli casi di studio.

Un quadro numerico delle mappe prodotte considerando le varie casistiche relative ai casi di studio e successivamente aggregate logicamente in layout (a titolo di esempio per un caso di studio un layout ennesimo raggruppa tutte le mappe di TU dei tre livelli trofici relativi ad una campagna considerando il *Best Case* senza l'applicazione dell'*Assessment factor*) è illustrato in Figura 10.

Caso di studio 1: parte terminale del bacino dell'Adda

Il fiume Adda è il principale affluente del Po e si sviluppa per un complesso di 343 Km interamente in regione Lombardia. Oggetto dell'analisi è l'ultimo tratto prima della confluenza in Po, compreso tra le province di Lodi e Cremona (il cosiddetto Adda sottolacuale, dopo il lago di Como). I dati analitici, acquisiti attraverso il geoportale di ARPA Lombardia, fanno riferimento a 18 stazioni per gli anni 2015-2017. In Fig. 11 è riportata la localizzazione su mappa delle 18 stazioni campionate, mentre in Tab. 5 è riportata una sintesi dei dati delle stazioni di monitoraggio.

Il numero di sostanze monitorate e considerate nell'applicazione del modello relativamente a questo

StazioniTevere	Nome_Corpo_Idrico	Codice_Europeo_Corpo_Idrico	Comune_1	Provincia_1	Tipologia_Monitoraggio	Stazioni *	Data	numSostanzeTot	num_xTU_Fish	num_xTU_Daphnia	num_xTU_Algae	Σ(xTU_Fish)	Σ(xTU_Daphnia)	Σ(xTU_Algae)	TIPO
Fiume Tevere 2	ITN010_TEVERE_11SSST_02	Torrta Tiberina	Rieti	Operativo	IT12-F3_76	Ottobre2015	33	26	26	26	20	0.010311	0.046342	0.008235	WC
Fiume Tevere 5	ITN010_TEVERE_14SSSD_03	Roma	Roma	Operativo	IT12-F4_05	Ottobre2015	36	27	26	21	0.046888	0.053646	0.026683	WC	
Fiume Tevere 5	ITN010_TEVERE_14SSSD_03	Roma	Roma	Operativo	IT12-F4_06	Ottobre2015	36	27	26	21	0.046888	0.053646	0.026683	WC	
Fiume Tevere 4	ITN010_TEVERE_14SSSD_02	Roma	Roma	Operativo	IT12-F4_07	Ottobre2015	36	26	27	21	0.046888	0.053646	0.026683	WC	
Fiume Tevere 3	ITN010_TEVERE_14SSSD_01	Montebretti	Roma	Operativo	IT12-F4_08	Ottobre2015	36	26	26	20	0.046888	0.053646	0.026683	WC	
Fiume Tevere 1	ITN010_TEVERE_11SSST_01	Bomarzo	Viterbo	Operativo	IT12-F5_26	Ottobre2015	38	28	29	22	0.019009	0.086481	0.027941	WC	
Fiume Tevere 2	ITN010_TEVERE_11SSST_02	Civita Castellana	Viterbo	Operativo	IT12-F5_27	Ottobre2015	38	29	28	22	0.019009	0.086481	0.027941	WC	

Figura 7.

Esempio di tabella virtuale output del join in ArcMap

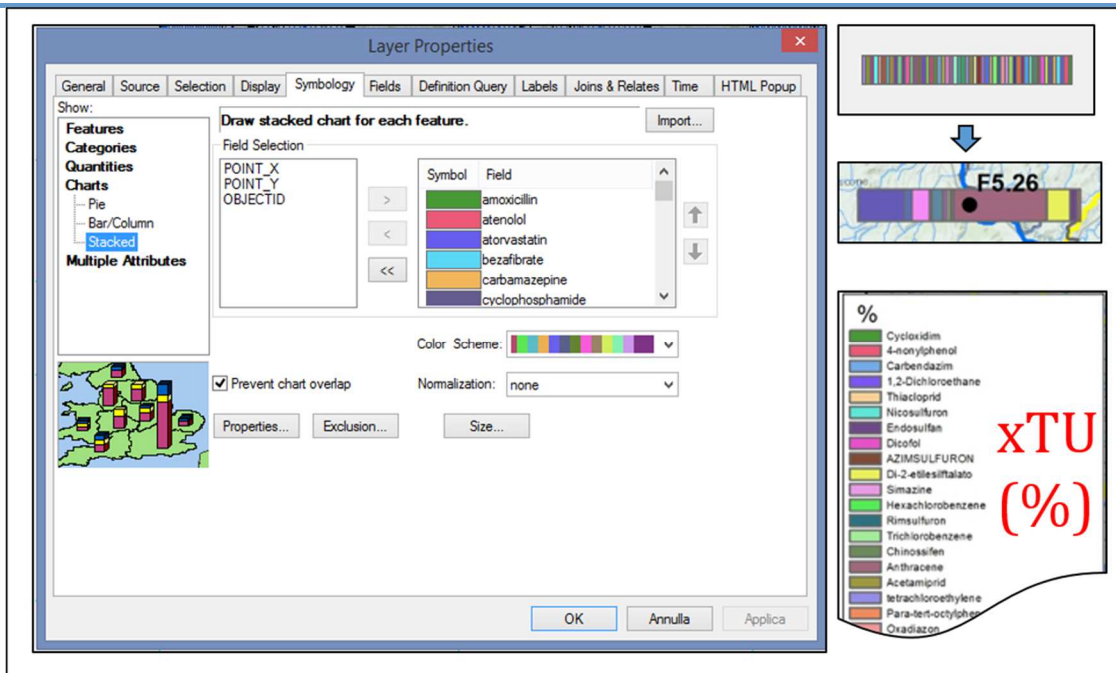


Figura 9. Simbologia disponibile in ArcGIS per visualizzare la xtu espressa in termini percentuali

bacino sono 182; di queste, 137 possiedono almeno un dato di ecotossicità e, dunque, sono state elaborate con il modello.

In Tabella 6 è riportato l'elenco delle sostanze dei punti di campionamento dell'Adda con i relativi LOQ. I dati di monitoraggio utilizzati nel modello sono quelli riferiti al periodo autunnale dei 3 anni 2015-2017. Questi dati sono stati tradotti in mappe tematiche

georeferenziate con la potenza della miscela.

Come si può vedere in Tabella 6, vi è una certa variabilità degli LOQ per una stessa sostanza; questa variabilità è stata riscontrata sia tra punti di monitoraggio differenti, sia per uno stesso punto con date di campionamento differenti. Tale fattore è stata una delle difficoltà nella gestione dei dati di monitoraggio in quanto non si è considerato un unico LOQ per so-

Tabella 5. Caso di studio Adda. Dati principali delle 18 stazioni di monitoraggio

Bacino idrografico	Codice stazione	Posizione	Prov.	Coord. X	Coord. Y	Dati nel 2015	Dati nel 2016	Dati nel 2017	Totale dati
Po	0013311ir_1	Acquanegra Cremonese - Riglio (Roggia)	CR	569644	5000750	408	0	0	408
Adda sub-lacuale	POAD3SEARCl01	Capernganica - Acqua Rossa (Roggia)	CR	550548	5021029	676	188	225	1089
Adda sub-lacuale	POAD3SMSTCl01	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	565827	5009190	408	204	749	1361
Adda sub-lacuale	POAD3MECA1l01	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	548476	5018303	196	204	317	717
Adda sub-lacuale	POAD3BECA1l01	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	546713	5020721	392	188	301	881
Serio	POAD3SECRCl01	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	554443	5021565	752	465	403	1620
Serio	POAD3SEMOCl01	Crema - Molinara (Roggia)	CR	554564	5024439	496	441	553	1490
Po	N00816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	578225	4997690	713	947	1532	1532
Po	N00816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	578225	4997690	713	947	1532	1660
Serio	N0080010238l01	Montodine - Serio (Fiume)	CR	555780	5014647	408	947	1528	2883
Adda sub-lacuale	N00800113l01	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	561386	5003420	408	947	1532	2887
Serio	N0080010762l01	Pizzighettone - Serio Morto	CR	563712	5006216	472	431	751	1654
Po	0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	575121	4998597	350	204	317	871
Adda sub-lacuale	POAD3MOCA1l01	Boffalora d'Adda - Mozzanica (Roggia)	LO	538066	5023527	198	234	249	681
Adda sub-lacuale	POAD3ACCA1l01	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	566289	4998165	759	840	744	2343
Po	POMOPBCA1l01	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	568347	4996159	759	841	852	2452
Adda sub-lacuale	N0080011931l01	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	544045	5021064	976	1177	640	2793
Adda sub-lacuale	N00800112l01	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	538139	5020770	1220	1416	711	3347

TEVERE		Mappe			
Campagna	tipo	Fish	Daphnia	Algae	Mappe
2015	TU	X	X	X	3
2016	TU	X	X	X	3
2017	TU	X	X	X	3
2015	TU-AF	X	X	X	3
2016	TU-AF	X	X	X	3
2017	TU-AF	X	X	X	3

Adda		Mappe			
Campagna	tipo	Fish	Daphnia	Algae	Mappe
2015	TU	X	X	X	3
2016	TU	X	X	X	3
2017	TU	X	X	X	3
2015	TU-AF	X	X	X	3
2016	TU-AF	X	X	X	3
2017	TU-AF	X	X	X	3

Campagna		Mappe			
tipo	Fish (%)	Daphnia (%)	Algae (%)	Mappe	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	

BC 27
WC 27
54

Scafa		Mappe			
Campagna	tipo	Fish	Daphnia	Algae	Mappe
Ott 2013	TU	X	X	X	3
Marzo 2014	TU	X	X	X	3
Ott 2014	TU	X	X	X	3
Aprile 2015	TU	X	X	X	3
Ott 2015	TU	X	X	X	3

Campagna		Mappe			
tipo	Fish (%)	Daphnia (%)	Algae (%)	Mappe	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	

Seveso-Lambro-Olona		Mappe				
Campagna	tipo	Fish	Daphnia	Algae	Caso	Mappe
2011	TU	X	X	X	WC	3
2011	TU	X	X	X	BC	3
2011	TU-AF	X	X	X	WC	3
2011	TU-AF	X	X	X	BC	3

Campagna		Mappe			
tipo	Fish (%)	Daphnia (%)	Algae (%)	Caso	Mappe
(xTU/TU)*100	X	X	X	WC	3
(xTU/TU)*100	X	X	X	BC	3

18

Ledra		Mappe				
Campagna	tipo	Fish	Daphnia	Algae	Caso	Mappe
2015	TU	X	X	X	WC	3
2015	TU	X	X	X	BC	3
2015	TU-AF	X	X	X	WC	3
2015	TU-AF	X	X	X	BC	3

Campagna		Mappe			
tipo	Fish (%)	Daphnia (%)	Algae (%)	Mappe	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	
(xTU/TU)*100	X	X	X	3	

18

Figura 10. Quadro numerico delle mappe prodotte

stanza nelle elaborazioni *best case* e *worst case*, che sono stati valutati caso per caso.

In totale sono state realizzate per i tre anni di campionamenti, 54 mappe tematiche (Tabella 7):

- 3 carte per ciascuna campagna (una per singolo organismo test) per il criterio *Worst case*;
- 3 carte per ciascuna campagna (una per singolo organismo test) per il criterio *Best case*;
- 3 carte per ciascuna campagna (una per singolo organismo test) per il criterio *Worst case* considerando l'*assessment factor*;
- 3 carte per ciascuna campagna (una per singolo

organismo test) per il criterio *Best case* considerando l'*assessment factor*.

I dati aggregati per singola campagna (2015-2016-2017), per i tre livelli trofici, per i criteri *Worst case* e *Best Case* utilizzati per la realizzazione delle carte di potenza della miscela sono riportati nelle Tabelle 8-13. In queste tabelle sono riportati: il numero di sostanze totali analizzate per singolo campionamento (settembre-dicembre 2015-2017), il numero di dati ecotossicologici per ciascun livello trofico (alga, daphnia, pesce) ed il risultato della unità di tossicità TU. Le carte tematiche relative alla potenza della miscela

espressa in unità di tossicità (TU) per le campagne considerate (periodo autunnale 2015-2017) per i tre livelli trofici, applicando i criteri *Worst case* e *Best Case*, senza e con *Assessment Factor*, sono riportate nelle Figure 12-23. Si ricorda che l'*Assessment factors* applicati sono i seguenti: alga: TU/0,1; pesce e dafnia: TU/0,01.

Considerazioni sul caso di studio Adda

Come si può vedere nelle tabelle che riportano i dati aggregati, per il criterio di *Best case* il numero di sostanze al di sopra del LOQ nei tre anni di monitoraggio e per i tre livelli trofici è molto limitato (max 7, vedi Tabelle 11-13 e Figure 14, 18 e 22). In ogni caso le TU corrispondenti hanno valori molto al di sotto di 1 (valore massimo riscontrato 0,02 in un caso nel 2017 relativo alle alghe (Tabella 13, Figura 22); gli altri valori TU massimi sono inferiori). Per il criterio *Worst case* (quindi considerando tutte le sostanze analizzate, anche quelle con concentrazione <LOQ, Tabelle 8-10 e Figure 12, 16 e 20), sebbene il numero di sostanze analizzate sia elevato (fino ad un massimo di 87 sostanze), i valori di TU hanno valori al di sotto di 1 (0,1 in un unico punto di campionamento relativo alle TU dei pesci, Tabella 8, Figura 12 - gli altri valori si aggirano intorno a 0,02-0,07). Questo significa che

Tabella 6. Elenco delle sostanze monitorate e considerate per il tratto di fiume Adda, con relativi numero CAS e valore di LOQ (mg/L) - continua nelle pagine successive

SOSTANZA	CAS	LOQ
(MCPA) Acido 2,4 meticlorofenossico acetico	94-74-6	<0,1; <0,03; <0,05
1,2,3-Triclorobenzene	87-61-6	<0,2; <0,5
1,2,4-Triclorobenzene	120-82-1	<0,2
1,2-Diclorobenzene	95-50-1	<0,2; <0,5
1,3 Diclorobenzene	541-73-1	<0,1; <0,2
1,4 Diclorobenzene	106-46-7	<0,1; <0,2
2,4,5-T	93-76-5	<0,03
2,4,6-Triclorofenolo	88-06-2	<1
2,4-Diclorofenolo	120-83-2	<1
2,4-Dicofol	10606-46-9	<0,01
2-Clorofenolo	95-57-8	<1
Acenafteene	83-32-9	<0,001
Acenaftilene	208-96-8	<0,001

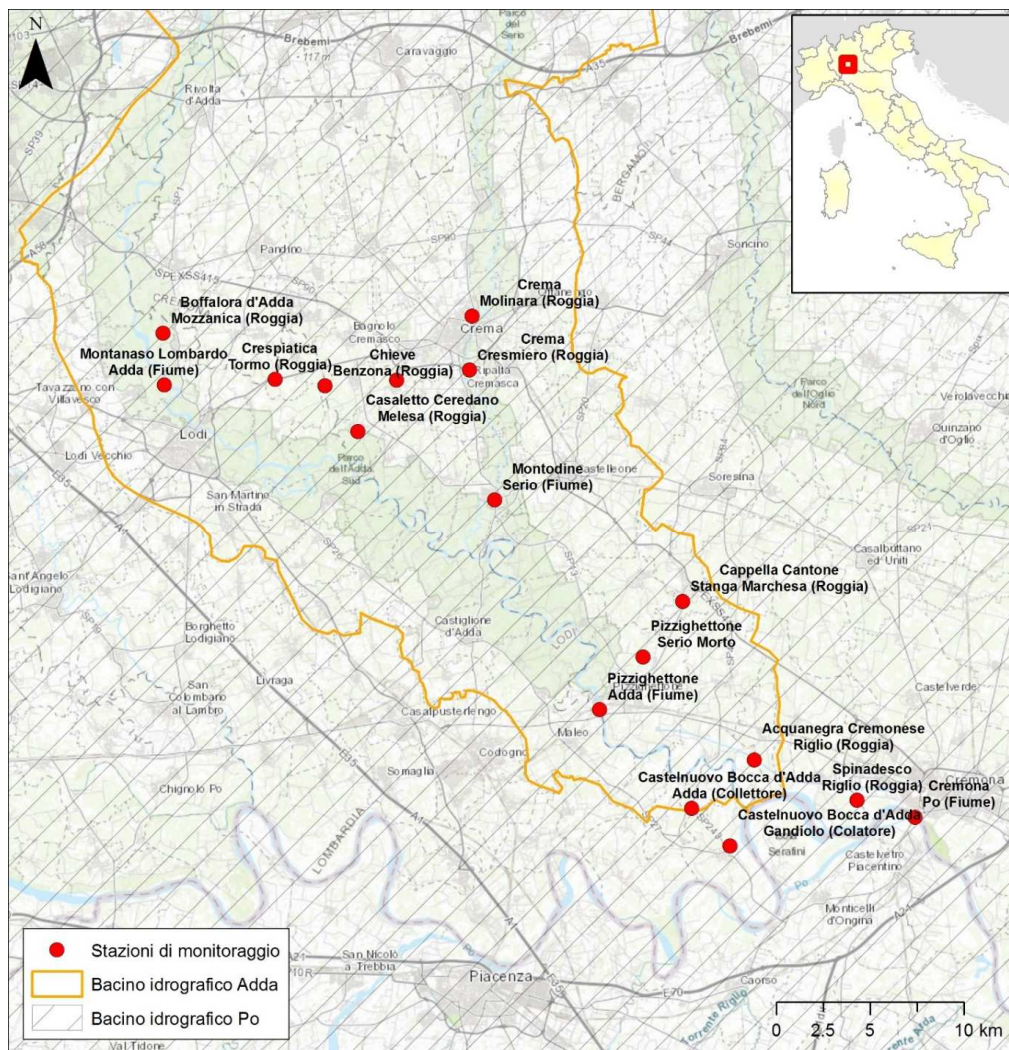


Figura 11. Inquadramento caso di studio fiume Adda. Stazioni di monitoraggio nel tratto considerato, comprese nelle provincie di Cremona e Lodi

SOSTANZA	CAS	LOQ	SOSTANZA	CAS	LOQ
Acetamidrid	135410-20-7	<0,009	Clordano cis	5103-71-9	<0,01
Acido 2,4 diclorofenossi acetico (2,4 D)	94-75-7	<0,03; 0,05	Clordano trans	5103-74-2	<0,01
ACLONIFEN	74070-46-5	0,01; <0,03	Clorobenzene	108-90-7	<0,2; <1
Alachlor	15972-60-8	<0,01; <0,02; <0,05	Clorpirifos	2921-88-2	<0,01; 0,02; 0,03
Aldrin	309-00-2	<0,01	Clorpirifos Metile	5598-13-0	<0,01; <0,02; <0,03
Ametrina	834-12-8	<0,01	Cloruro di Vinile	75-01-4	<0,05; <0,5
AMPA	1066-51-9	<0,01; <0,05	Crisene	218-01-9	<0,001; <0,01
Antracene	120-12-7	<0,001; <0,01	Cybutrine	28159-98-0	<0,01
Atrazina	1912-24-9	<0,01; <0,02; <0,03	Cycloxdim	101205-02-1	<0,03
Atrazina deisopropil	1007-28-9	<0,02; 0,05	DDD	72-54-8	<0,01
Atrazina-desetil	6190-65-4	<0,02; <0,05	DDD o,p	53-19-0	<0,01
Atrazina-desisopropil	1007-28-9	<0,02; <0,05	DDD p,p	72-54-8	<0,01
Azimsulfuron	120162-55-2	<0,03; 0,05	DDD,DDT,DDE	CHM-DDEDDD-DDT	<0,1
Bensulfuron Metile	83055-99-6	<0,03; 0,05	DDE	72-55-9	<0,01
Bentazone	25057-89-0	<0,03; <0,05	DDE o,p	3424-82-6	<0,01
Benzene	71-43-2	<0,1; <0,2	DDE p,p	72-55-9	<0,01
Benzil-butiril-ftalato	85-68-7	<0,5	DDT	8017-34-3	<0,01
Benzo (a) pirene	50-32-8	<0,001; <0,01	DDT o,p	789-02-6	<0,01
Benzo (b) fluorantene	205-99-2	<0,001; <0,01	Di-2-etilesilftalato	117-81-7	<0,5
Benzo(g,h,i)perylene	191-24-2	<0,001; <0,01	Diazinone	333-41-5	<0,02
Benzo(k)fluorantene	207-08-9	<0,001; <0,01	Dibenzo(a,h)antracene	53-70-3	<0,001; 0,01
Beta-Esaclorocicloesano	319-85-7	<0,01; <0,05	Dibenzo(a,h)pirene	189-60-4	<0,001
Bis(2-metilpropil)ftalato	84-69-5	<4	Dibromoclorometano	124-48-1	<0,05; <0,1
Bisfenolo A	80-05-7	<1	Dibutil-ftalato	84-74-2	<0,5
Bromacil	314-40-9	<0,02; <0,05	Dicamba	1918-00-9	<0,05; <0,01
Bromodichlorometano	75-27-4	<0,05; 0,01	Diclofenac	15307-86-5	<0,05
Bromopropilato	18181-80-1	<0,01	Diclorobenzammide 2,6	2008-58-4	<0,02; <0,05
Chinossifen	124495-18-7	<0,01	Dicloroetano 1,2	107-06-2	<0,05; <0,1
Chlordano Totale	57-74-9	<0,01	Diclorometano	75-09-2	<0,5
Chlorfenvinphos	470-90-6	<0,01; <0,02	Dicofol	115-32-2	<0,01
Chloridazon	1698-60-8	<0,03	Dieldrin	60-57-1	<0,01
Cianazina	21725-46-2	<0,02	Dietil-Ftalato (DEP)	84-66-2	<0,5
Cibutrina	28159-98-0	<0,01	Dimetil-ftalato (DMP)	131-11-3	<0,5

SOSTANZA	CAS	LOQ	SOSTANZA	CAS	LOQ
Dimetoato	60-51-5	<0,03; <0,05	Isoproturon	34123-59-6	<0,03; <0,05
Di-n-ottilftalato	117-84-0	<0,5	Isoxaflutol	141112-29-0	<0,03
Diuron	330-54-1	<0,03; <0,05	Linuron	330-55-2	<0,03; <0,05
Endosulfan (isomeri alfa e beta)	115-29-7	<0,01; <0,03; <0,05	m+p-Xilene	CHM-MP-XIL	<0,4
Endosulfan alfa	959-98-8	<0,01	Malathion	121-75-5	<0,01
Endosulfan beta	33213-65-9	<0,01	MCPA	94-74-6	<0,05; <0,1
Endosulfan solfato	1031-07-8	<0,01	Mecoprop	93-65-2	<0,03; <0,05; <0,1
Endrin	72-20-8	<0,01; <0,03	Metalaxyl	57837-19-1	<0,01; <0,02
Eptacloro	76-44-8	<0,01; 0,05	METAMITRON	41394-05-2	<0,03; <0,05
Eptacloro epossido	1024-57-3	<0,01; <0,05	Metiocarb	2032-65-7	<0,01
Eptacloro Epossido endo	28044-83-9	<0,01	Metolachlor	51218-45-2	<0,01; <0,02; <0,03
Esaclorobenzene	118-74-1	<0,01; <0,02	Metribuzin	21087-64-9	<0,03; <0,05
Esaclorobutadiene	87-68-3	<0,05; <0,1	Mevinfos	7786-34-7	<0,005
Esaclorocicloesano	608-73-1	<0,01	Mevinphos	26718-65-0	<0,005
Esazinone	51235-04-2	<0,02	Mirex	2385-85-5	<0,01
ETBE (etil terbutil etere)	637-92-3	<0,5; <1; <2	Molinate	2212-67-1	<0,01; <0,02; <0,03
Etilbenzene	100-41-4	<0,2; <0,5; <1	Monoclorobenzene	108-90-7	<0,2
Fenantrene	85-01-8	<0,001	MTBE (metil terbutil etere)	1634-04-4	<0,5; <1; <2
Fenitrotion	122-14-5	<0,005; <0,01	Naftalene	91-20-3	<0,001; <0,1
Fenthion	55-38-9	<0,005	Nicosulfuron	111991-09-4	<0,03; <0,05
Flufenacet	142459-58-3	<0,02	o,p'-DDD	53-19-0	<0,01
Fluorantene	206-44-0	<0,001; <0,01	o,p'-DDE	3424-82-6	<0,01
Fluorene	86-73-7	<0,001	o,p'-DDT	789-02-6	<0,01
Glifosate	1071-83-6	<0,05; <0,1	Oxadiazon	19666-30-9	<0,01; <0,02; <0,03
HCH alfa	319-84-6	<0,01; <0,05	Oxadixyl	77732-09-3	<0,02
HCH delta	319-86-8	<0,01; <0,03	Oxychlorano	27304-13-8	<0,01
HCH gamma (lindano)	58-89-9	<0,01; <0,03	Oxydemeton-metile	301-12-2	<0,03
HCH-beta	319-85-7	<0,01	p,p'-DDT	50-29-3	<0,01; <0,05
Idrocarburi policiclici aromatici	CHM-IPA-0	<0,001; <0,05	para-terz-ottifenolo	140-66-9	<0,1
Imidacloprid	138261-41-3	<0,009; <0,05	Paration etile	56-38-2	<0,01; <0,02; <0,03
Indeno(1,2,3-cd)pirene	193-39-5	<0,001; <0,01	Paration metile	298-00-0	<0,02
Isodrin	465-73-6	<0,01; <0,03	Pendimetalin	40487-42-1	<0,01; <0,02; 0,03
Isopropilbenzene	98-82-8	<0,2	Pentaclorobenzene	608-93-5	<0,01; <0,03; <0,5

SOSTANZA	CAS	LOQ	SOSTANZA	CAS	LOQ
Pentaclorofenolo	87-86-5	<0,5	Terbutilazina	5915-41-3	<0,01; <0,02; <0,03
PFDA (Perfluoro Decanoic Acid)	335-76-2	<0,005	Terbutilazina desetil	30125-63-4	<0,01; <0,02; <0,05
PFDoA (Perfluoro Dodecanoic Acid)	307-55-1	<0,005	Terbutrina	886-50-0	<0,01; <0,02
PFHxS (Perfluoro Hexane Sulfonate)	355-46-4	<0,005	Tetracloroetano 1,1,2,2	79-34-5	<0,05
PFNA (Perfluoro Nonanoic Acid)	375-95-1	<0,005	Tetracloroetilene	127-18-4	<0,05; <0,1
PFUdA (Perfluoro Undecanoic Acid)	2058-94-8	<0,005	Tetracloruro di carbonio	56-23-5	<0,05; <0,1
Pirene	129-00-0	<0,001; <0,01	Tetraclorvinfos	22248-79-9	<0,01; <0,02
Pirimicarb	23103-98-2	<0,01	Tetradifon	116-29-0	<0,01
p-nonilfenolo	104-40-5	<0,3	Thiacloprid	111988-49-9	<0,009
Pretilachlor	51218-49-6	<0,02	Thiobencarb	28249-77-6	<0,02
Prometrina	7287-19-6	<0,01	Toluene	108-88-3	<0,1; <0,2; <1
Propanil	709-98-8	<0,02; <0,05	Triallate	2303-17-5	<0,03
Propazina	139-40-2	<0,01; <0,02	Tribromometano	75-25-2	<0,05; <0,1
Protoate	2275-18-5	<0,02	Triclorobenzene (somma isomeri)	12002-48-1	<1
Quinclorac	84087-01-4	<0,03; <0,05	Triclorobenzene 1,3,5	108-70-3	<0,2; 0,5
Quinoxifen	124495-18-7	<0,01	Triclorobenzeni	12002-48-1	<0,3; <1
Rimsulfuron	122931-48-0	<0,03	Tricloroetano 1,1,1	71-55-6	<0,05; <0,1
Secbutilazina	7286-69-3	<0,02	Tricloroetilene	79-01-6	<0,05; <0,1
Simazina	122-34-9	<0,01; <0,02; <0,05	Triclorometano	67-66-3	<0,05; 0,1
Stirene	100-42-5	<0,2; <0,5; <1	Trifluralin	1582-09-8	<0,01; <0,02; <0,03; <0,05
SULCOTRIONE	99105-77-8	<0,03; <0,05	Xilene (somma isomeri)	1330-20-7	<3
TCEP (tris-2cloroetil-fosfato)	115-96-8	<0,02; <0,05	Xilene orto	95-47-6	<0,2

Tabella 7. Caso di studio 1 (Adda): elenco, per ciascun organismo (alga, dafnia e pesce) delle mappe tematiche prodotte con il modello di additività dose/concentrazione per la creazione dell'unità di tossicità (TU) delle TU a cui è stato applicato l'assessment factor e delle mappe descrittive del peso (in termini %) di ciascuna sostanza sulla potenza della miscela

Adda					
Campagna	tipo	Fish	Daphnia	Algae	numero mappe
2015	TU	X	X	X	3
2016	TU	X	X	X	3
2017	TU	X	X	X	3
2015	TU-AF	X	X	X	3
2016	TU-AF	X	X	X	3
2017	TU-AF	X	X	X	3
Campagna	tipo	Fish (%)	Daphnia (%)	Algae (%)	numero mappe
2015	(xTU/TU)*100	X	X	X	3
2016	(xTU/TU)*100	X	X	X	3
2017	(xTU/TU)*100	X	X	X	3
					27 BC
					27 WC
					54

Tabella 8. Dati aggregati; numero di sostanze monitorate, numero di sostanze per il calcolo delle xTU per ciascun livello trofico e risultante della potenza della miscela per ciascun livello trofico. Adda, campagna 2015; worst case

Codice Stazione	Località	PV	Data campionamento	WORST CASE					
				Numero sostanze			TU		
				Fish	Daphnia	Algae	Fish	Daphnia	Algae
0013311ir_1	Acquanegra Cremonese - Riglio (Roggia)	CR	24/11/2015	35	21	32	5,27E-02	1,92E-02	1,74E-02
POAD3MOCA1lo1	Boffalora d'Adda - Mozzanica (Roggia)	LO	29/09/2015	35	21	32	5,27E-02	1,92E-02	1,61E-02
POAD3SEARClO1	Capergnanica - Acqua Rossa (Roggia)	CR	27/10/2015	48	22	40	1,05E-01	1,22E-02	2,18E-02
POAD3SMSTClO1	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	21/10/2015	24	11	20	5,27E-02	6,08E-03	1,61E-02
POAD3MECA1lo1	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	01/12/2015	35	21	32	5,27E-02	1,92E-02	1,64E-02
POAD3ACCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	10/11/2015	48	22	41	3,90E-02	8,04E-03	3,28E-02
POMOPBCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	10/11/2015	48	22	41	3,90E-02	6,65E-03	3,37E-02
POAD3BECA1lo1	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	27/10/2015	24	11	20	5,26E-02	6,08E-03	1,07E-02
POAD3SECRClO1	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	30/11/2015	40	21	37	4,24E-02	2,05E-02	1,76E-02
POAD3SEMOClo1	Crema - Molinara (Roggia)	CR	30/11/2015	40	21	37	5,32E-02	1,92E-02	1,65E-02
N00816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	26/11/2015	40	21	37	5,82E-02	1,92E-02	1,65E-02
N0080011931lo1	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	17/11/2015	49	22	42	4,08E-02	6,65E-03	3,09E-02
N00800112lo1	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	17/11/2015	53	22	46	4,03E-02	6,65E-03	2,88E-02
N0080010238lo1	Montodine - Serio (Fiume)	CR	08/09/2015	35	21	32	5,27E-02	1,92E-02	1,61E-02
N00800113lo1	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	10/12/2015	24	11	20	5,26E-02	6,08E-03	1,11E-02
N0080010762lo1	Pizzighettone - Serio Morto	CR	21/10/2015	24	11	20	5,26E-02	6,08E-03	1,30E-02
0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	24/11/2015	35	21	32	5,27E-02	1,92E-02	1,61E-02

Per il criterio Worst case autunno 2015, sono state analizzate tra 11 e 53 sostanze e i valori di TU massimi sono 0,1 (in 1 punto di campionamento per i pesci), 0,02 (12 punti di campionamento per dafnia) e 0,03 (in 3 punti di campionamento per alghe).

Tabella 9. Dati aggregati; numero di sostanze monitorate, numero di sostanze per il calcolo delle xTU per ciascun livello trofico e risultante della potenza della miscela per ciascun livello trofico. Adda, campagna 2016 ; worst case

Codice Stazione	Località	PV	Data campionamento	WORST CASE					
				Numero sostanze			TU		
				Fish	Daphnia	Algae	Fish	Daphnia	Algae
POAD3MOCA1lo1	Boffalora d'Adda - Mozzanica (Roggia)	LO	21/11/2016	43	26	40	2,21E-02	1,76E-02	2,07E-02
POAD3SEARClO1	Capergnanica - Acqua Rossa (Roggia)	CR	22/11/2016	38	26	35	2,10E-02	1,84E-02	2,21E-02
POAD3SMSTClO1	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	22/11/2016	38	26	35	2,11E-02	2,31E-02	2,19E-02
POAD3MECA1lo1	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	21/11/2016	38	26	35	2,11E-02	1,84E-02	3,10E-02
POAD3ACCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	08/11/2016	49	23	41	3,86E-02	1,20E-02	4,65E-02
POMOPBCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	08/11/2016	49	23	41	3,86E-02	1,02E-02	3,88E-02
POAD3BECA1lo1	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	27/09/2016	38	26	35	2,10E-02	1,80E-02	2,10E-02
POAD3SECRClO1	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	22/11/2016	44	26	40	2,20E-02	1,98E-02	2,29E-02
POAD3SEMOClo1	Crema - Molinara (Roggia)	CR	22/11/2016	43	26	40	2,16E-02	2,12E-02	2,28E-02
N00816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	03/11/2016	44	26	40	2,20E-02	1,76E-02	2,12E-02
N0080011931lo1	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	15/11/2016	50	23	42	3,91E-02	5,80E-03	2,68E-02
N00800112lo1	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	15/11/2016	54	23	46	4,03E-02	5,80E-03	2,72E-02
N0080010238lo1	Montodine - Serio (Fiume)	CR	07/09/2016	44	26	40	2,21E-02	1,98E-02	2,88E-02
N00800113lo1	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	03/11/2016	44	26	40	2,20E-02	1,89E-02	2,17E-02
N0080010762lo1	Pizzighettone - Serio Morto	CR	03/11/2016	39	26	35	2,15E-02	1,85E-02	2,13E-02
0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	15/11/2016	38	26	35	2,10E-02	1,80E-02	2,10E-02

Per il criterio Worst case autunno 2016, sono state analizzate tra 26 e 54 sostanze e i valori di TU sono tra 0,02 e 0,04 (in un complessivo numero di 14 punti di campionamento).

Tabella 10. Dati aggregati; numero di sostanze monitorate, numero di sostanze per il calcolo delle xTU per ciascun livello trofico e risultante della potenza della miscela per ciascun livello trofico. Adda, campagna 2017; worst case

Codice Stazione	Località	PV	Data campionamento	WORST CASE					
				Numero sostanze			TU		
				Fish	Daphnia	Algae	Fish	Daphnia	Algae
POAD3MOCA1lo1	Boffalora d'Adda - Mozzanica (Roggia)	LO	28/11/2017	59	29	50	3,02E-02	2,00E-02	3,07E-02
POAD3SEARClO1	Capergnanica - Acqua Rossa (Roggia)	CR	29/11/2017	56	27	48	2,81E-02	1,95E-02	2,83E-02
POAD3SMSTClO1	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	07/11/2017	57	28	49	2,81E-02	1,93E-02	2,92E-02
POAD3MECA1lo1	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	28/11/2017	56	27	48	2,81E-02	1,78E-02	2,57E-02
POAD3ACCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	23/11/2017	58	29	50	2,80E-02	1,76E-02	2,56E-02
POMOPBCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	23/11/2017	58	29	50	2,80E-02	1,76E-02	2,55E-02
POAD3BECA1lo1	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	30/11/2017	56	27	48	2,81E-02	1,79E-02	2,79E-02
POAD3SECRClO1	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	29/11/2017	63	29	54	3,07E-02	2,14E-02	3,07E-02
POAD3SEMOClo1	Crema - Molinara (Roggia)	CR	30/11/2017	60	27	52	2,85E-02	2,00E-02	2,76E-02
NO0816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	07/11/2017	87	49	78	4,16E-02	6,85E-02	6,17E-02
NO080011931lo1	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	12/09/2017	63	30	55	2,87E-02	1,83E-02	2,68E-02
NO0800112lo1	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	08/11/2017	1	0	1	8,27E-04		3,64E-06
NO080010238lo1	Montodine - Serio (Fiume)	CR	07/11/2017	87	49	78	4,16E-02	6,98E-02	4,86E-02
NO0800113lo1	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	07/11/2017	87	49	78	4,16E-02	6,91E-02	4,67E-02
NO080010762lo1	Pizzighettone - Serio Morto	CR	23/11/2017	59	29	50	3,02E-02	2,04E-02	2,91E-02
0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	23/11/2017	56	27	48	2,81E-02	1,79E-02	2,57E-02

Per il criterio Worst case autunno 2017, sono state analizzate tra 27 e 87 sostanze e i valori di TU sono tra 0,03 e 0,07 (in un complessivo numero di 7 punti di campionamento).

Tabella 11. Dati aggregati; numero di sostanze monitorate, numero di sostanze per il calcolo delle xTU per ciascun livello trofico e risultante della potenza della miscela per ciascun livello trofico. Adda, campagna 2015; best case.

Codice Stazione	Località	PV	Data campionamento	BEST CASE					
				Numero sostanze			TU		
				Fish	Daphnia	Algae	Fish	Daphnia	Algae
0013311ir_1	Acquanegra Cremonese - Riglio (Roggia)	CR	24/11/2015	1	1	1	1,36E-05	1,42E-06	2,50E-03
POAD3MOCA1lo1	Boffalora d'Adda - Mozzanica (Roggia)	LO	29/09/2015	0	0	0			
POAD3SEARClO1	Capergnanica - Acqua Rossa (Roggia)	CR	27/10/2015	1	1	1	5,00E-06	2,14E-06	6,43E-04
POAD3SMSTClO1	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	21/10/2015	1	1	1	3,64E-05	3,77E-06	6,67E-03
POAD3MECA1lo1	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	01/12/2015	1	1	1	3,33E-06	1,43E-06	4,29E-04
POAD3ACCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	10/11/2015	4	4	4	4,64E-05	1,63E-03	5,15E-03
POMOPBCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	10/11/2015	2	2	2	3,35E-05	4,02E-06	6,05E-03
POAD3BECA1lo1	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	27/10/2015	0	0	0			
POAD3SECRClO1	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	30/11/2015	1	1	1	8,89E-06	2,11E-03	6,78E-04
POAD3SEMOClo1	Crema - Molinara (Roggia)	CR	30/11/2015	1	1	1	1,04E-06	7,83E-07	2,70E-06
NO0816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	26/11/2015	1	1	1	2,31E-07	1,74E-07	6,00E-07
NO080011931lo1	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	17/11/2015	3	2	4	1,84E-03	3,32E-06	3,38E-03
NO0800112lo1	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	17/11/2015	1	1	1	1,67E-06	7,14E-07	2,14E-04
NO080010238lo1	Montodine - Serio (Fiume)	CR	08/09/2015	1	1	1	5,00E-07	3,77E-07	1,30E-06
NO0800113lo1	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	10/12/2015	1	1	1	4,44E-06	1,90E-06	5,71E-04
NO080010762lo1	Pizzighettone - Serio Morto	CR	21/10/2015	2	2	2	2,15E-05	3,32E-06	3,76E-03
0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	24/11/2015	1	1	1	6,15E-07	4,64E-07	1,60E-06

Per il criterio Best case 2015, sono state riscontrate al massimo 4 sostanze >LOQ (su un complessivo numero massimo di 53 sostanze monitorate) e i valori di TU sono tra 0,002 e 0,006 (in un complessivo numero di 3 punti di campionamento)

Tabella 12. Dati aggregati; numero di sostanze monitorate, numero di sostanze per il calcolo delle xTU per ciascun livello trofico e risultante della potenza della miscela per ciascun livello trofico. Adda, campagna 2016; *best case*.

Codice Stazione	Località	PV	Data campionamento	BEST CASE					
				Numero sostanze			TU		
				Fish	Daphnia	Algae	Fish	Daphnia	Algae
POAD3SMSTCl01	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	22/11/2016	5	5	5	7,21E-05	5,88E-03	2,04E-03
POAD3MECA1lo1	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	21/11/2016	4	3	4	8,82E-05	1,06E-03	1,12E-02
POAD3ACCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	08/11/2016	5	5	5	2,90E-05	7,37E-03	2,57E-02
POMOPBCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	08/11/2016	5	5	5	2,83E-05	5,65E-03	1,80E-02
POAD3BECA1lo1	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	27/09/2016	4	4	4	9,17E-06	5,28E-04	1,22E-03
POAD3SECRClo1	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	22/11/2016	4	4	4	2,55E-05	2,57E-03	2,65E-03
POAD3SEMOClo1	Crema - Molinara (Roggia)	CR	22/11/2016	5	5	5	4,10E-05	3,97E-03	2,59E-03
NO0816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	03/11/2016	3	3	3	5,66E-06	1,13E-06	9,06E-04
NO080011931lo1	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	15/11/2016	3	2	4	5,54E-04	3,69E-06	1,30E-03
NO0800112lo1	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	15/11/2016	4	3	4	3,78E-04	3,32E-06	2,31E-03
NO080010238lo1	Montodine - Serio (Fiume)	CR	07/09/2016	6	6	6	5,52E-05	2,35E-03	8,76E-03
NO0800113lo1	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	03/11/2016	4	4	4	1,30E-05	1,58E-03	1,54E-03
NO080010762lo1	Pizzighettone - Serio Morto	CR	03/11/2016	4	4	4	1,37E-05	1,29E-03	1,44E-03
0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	15/11/2016	5	5	5	1,14E-05	7,60E-04	1,18E-03

Nel criterio *Best case* 2016, sono state riscontrate al massimo tra 1 e 5 sostanze >LOQ (su un complessivo numero massimo di 54 sostanze monitorate) e i valori di TU sono tra 0,01 e 0,0005 (in un complessivo numero di 4 punti di campionamento).

Tabella 13. Dati aggregati; numero di sostanze monitorate, numero di sostanze per il calcolo delle xTU per ciascun livello trofico e risultante della potenza della miscela per ciascun livello trofico. Adda, campagna 2017; *best case*.

Codice Stazione	Località	PV	Data campionamento	BEST CASE					
				Numero sostanze			TU		
				Fish	Daphnia	Algae	Fish	Daphnia	Algae
POAD3MOCA1lo1	Boffalora d'Adda - Mozzanica (Roggia)	LO	28/11/2017	2	1	2	1,08E-05	7,14E-07	4,38E-03
POAD3SEARCl01	Capergnanica - Acqua Rossa (Roggia)	CR	29/11/2017	5	5	5	2,85E-05	2,35E-03	3,86E-03
POAD3SMSTCl01	Cappella Cantone - Stanga Marchesa (Roggia)	CR	07/11/2017	6	6	6	1,02E-04	2,06E-03	5,38E-03
POAD3MECA1lo1	Casaletto Ceredano - Melesa (Roggia)	CR	28/11/2017	4	4	4	8,38E-06	5,28E-04	1,15E-03
POAD3ACCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Adda (Collettore)	LO	23/11/2017	3	3	3	5,29E-06	8,55E-07	9,05E-04
POMOPBCA1lo1	Castelnuovo Bocca d'Adda - Gandiolo (Colatore)	LO	23/11/2017	2	2	2	4,93E-06	7,62E-07	8,34E-04
POAD3BECA1lo1	Chieve - Benzona (Roggia)	CR	30/11/2017	5	4	5	2,01E-05	7,60E-04	5,38E-03
POAD3SECRClo1	Crema - Cresmiero (Roggia)	CR	29/11/2017	6	6	6	2,08E-05	1,82E-03	2,71E-03
POAD3SEMOClo1	Crema - Molinara (Roggia)	CR	30/11/2017	4	4	4	2,50E-05	2,87E-03	2,80E-03
NO0816ir1	Cremona - Po (Fiume)	CR	07/11/2017	4	3	4	5,45E-05	3,52E-04	2,17E-02
NO080011931lo1	Crespiatica - Tormo (Roggia)	LO	12/09/2017	4	3	4	6,50E-04	5,28E-04	2,12E-03
NO0800112lo1	Montanaso Lombardo - Adda (Fiume)	LO	08/11/2017	1	0	1	8,27E-04		3,64E-06
NO080010238lo1	Montodine - Serio (Fiume)	CR	07/11/2017	7	7	7	3,41E-05	2,22E-03	2,99E-03
NO0800113lo1	Pizzighettone - Adda (Fiume)	CR	07/11/2017	1	1	1	1,03E-05	9,30E-04	7,01E-07
NO080010762lo1	Pizzighettone - Serio Morto	CR	23/11/2017	5	5	5	1,17E-05	7,60E-04	1,29E-03
0013311ir1	Spinadesco - Riglio (Roggia)	CR	23/11/2017	4	4	4	1,04E-05	7,60E-04	1,15E-03

Nel criterio *Best case* 2017, ci sono al massimo 7 sostanze con valori > LOQ su un complessivo numero di 87 sostanze monitorate. La TU massima riscontrata per i tre livelli trofici è: 0,0008 nel caso del pesce (1 solo caso, il resto i valori sono inferiori), 0,002 per dafnia (in tre casi) e 0,002 in un solo caso per alghe.

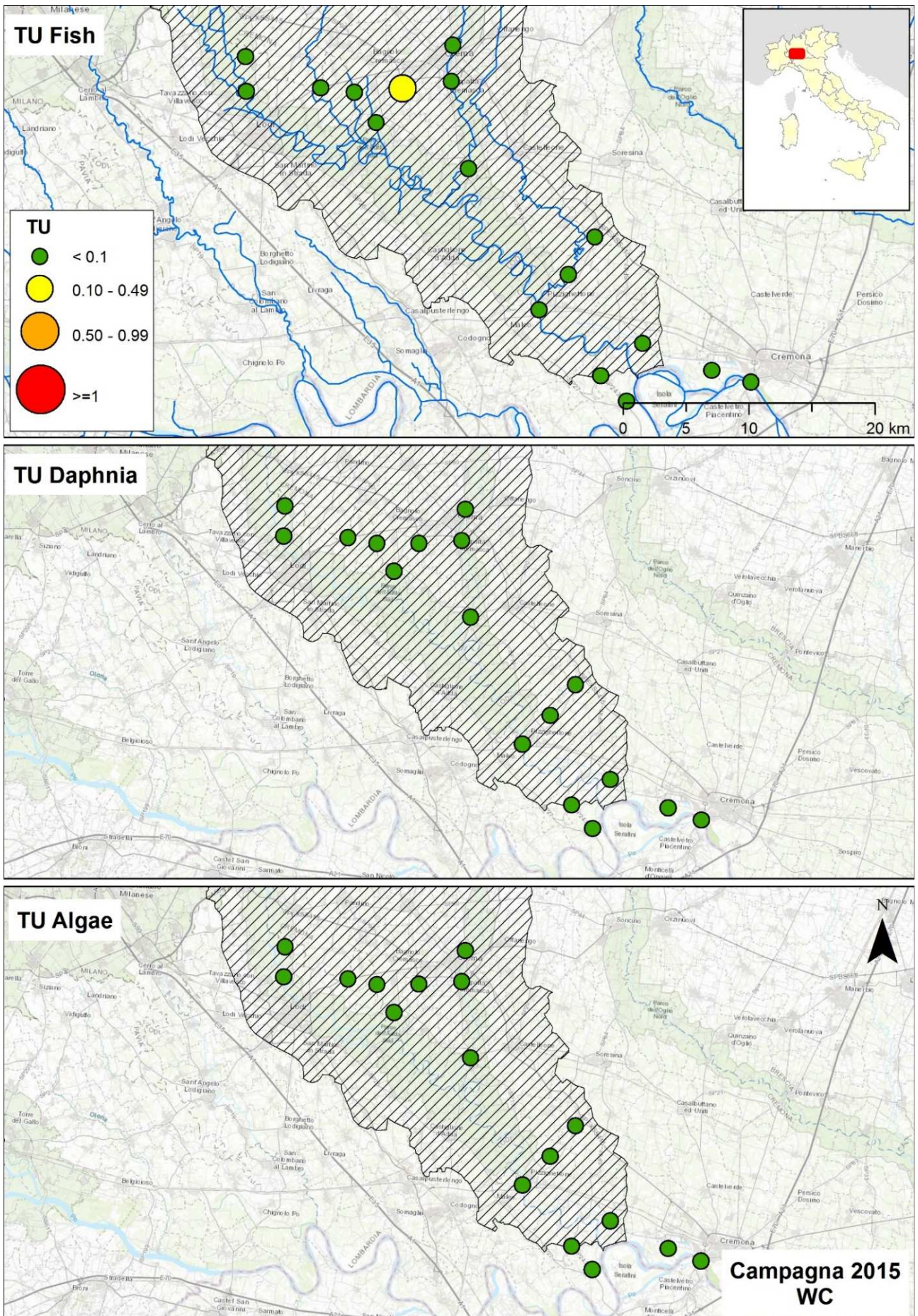


Figura 12. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2015; Worst Case (WC); dati Tabella 8.

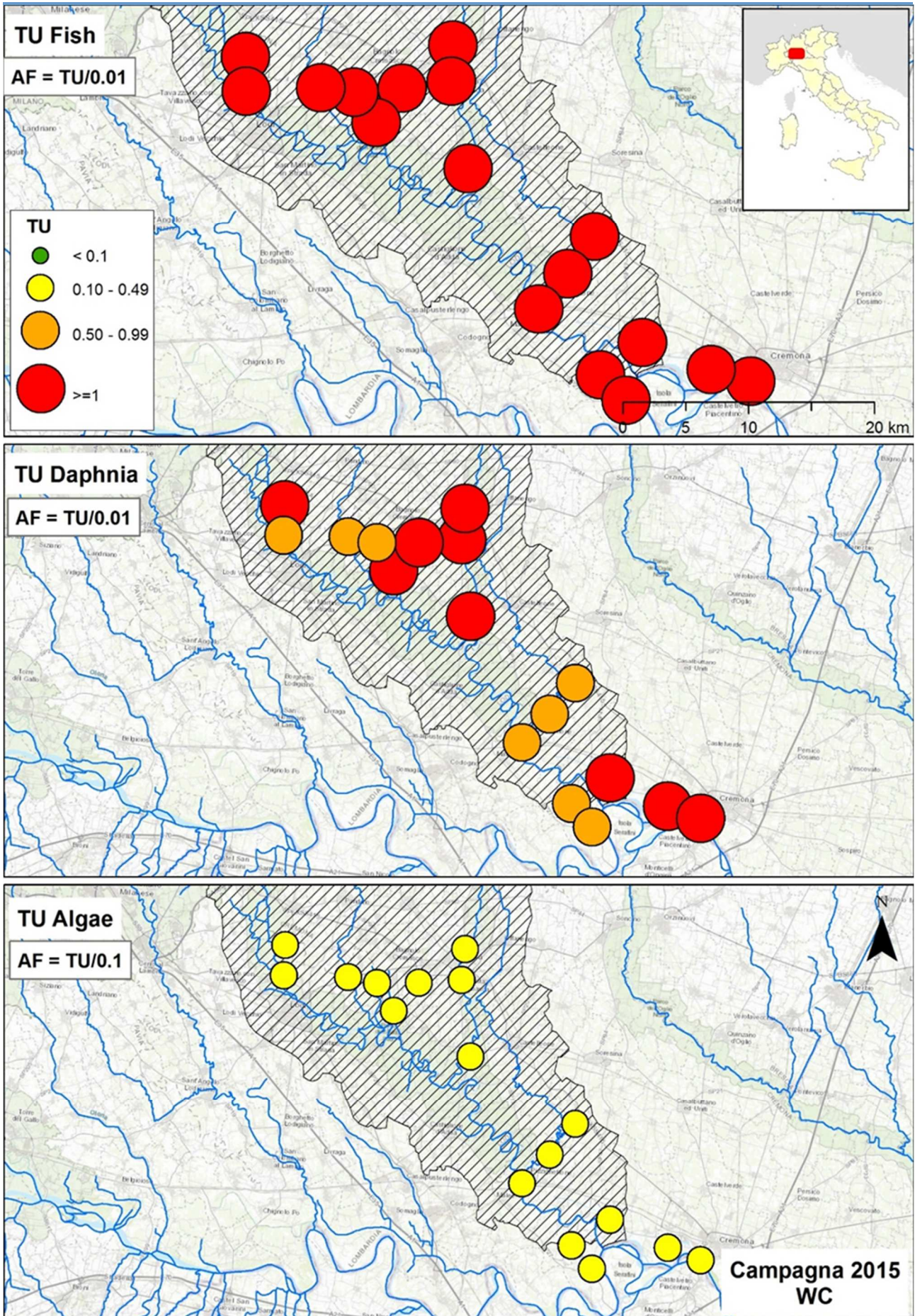


Figura 13. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2015; Worst Case (WC), Con Assessment Factor (AF). Dati Tabella 8 ai quali sono stati applicati gli AF.

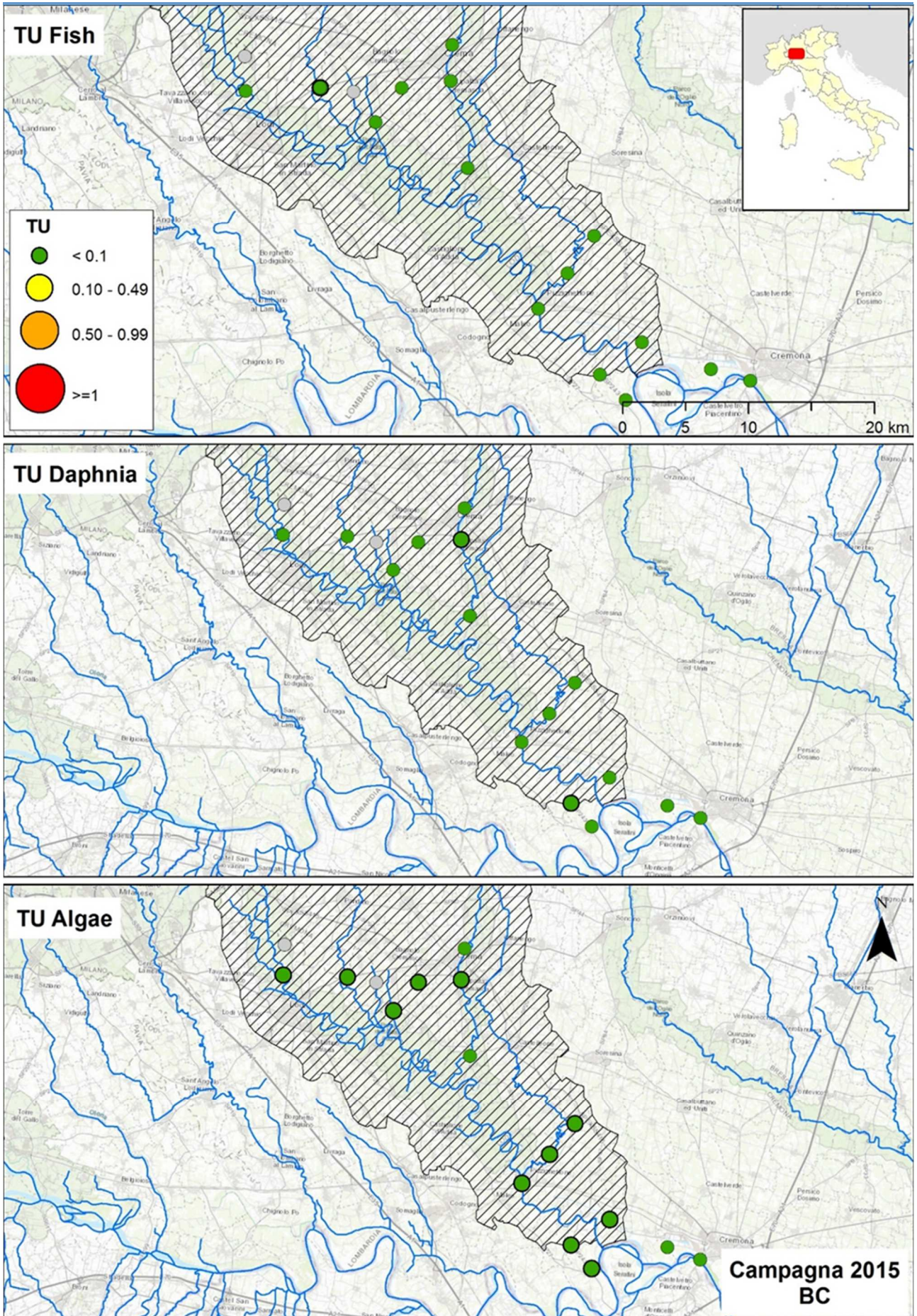


Figura 14. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2015; Best Case (BC). Dati Tabella 11

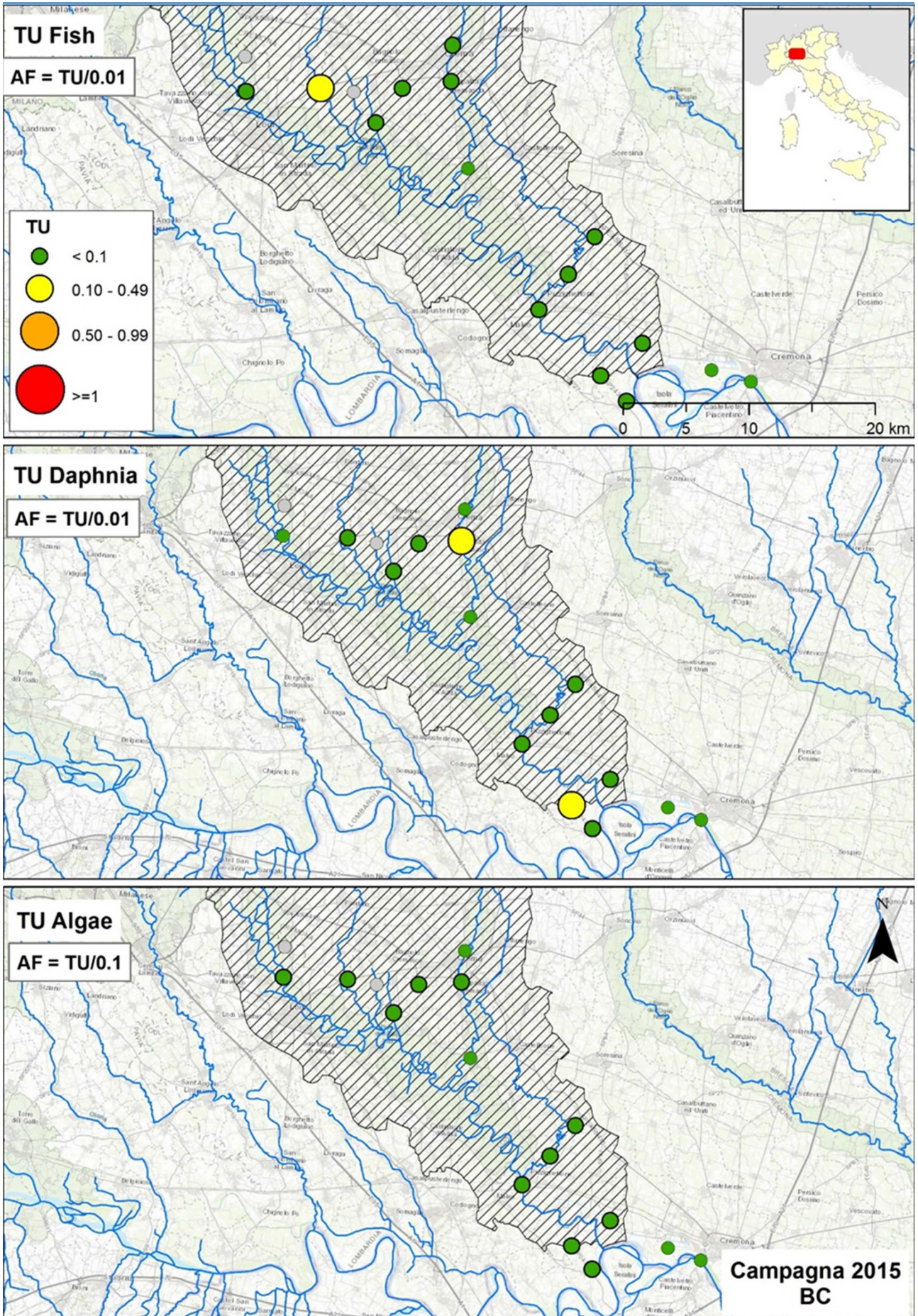


Figura 15. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2015; Best Case (BC) con Assessment Factor (AF). Dati tabella 11 ai quali sono stati applicati gli AF.

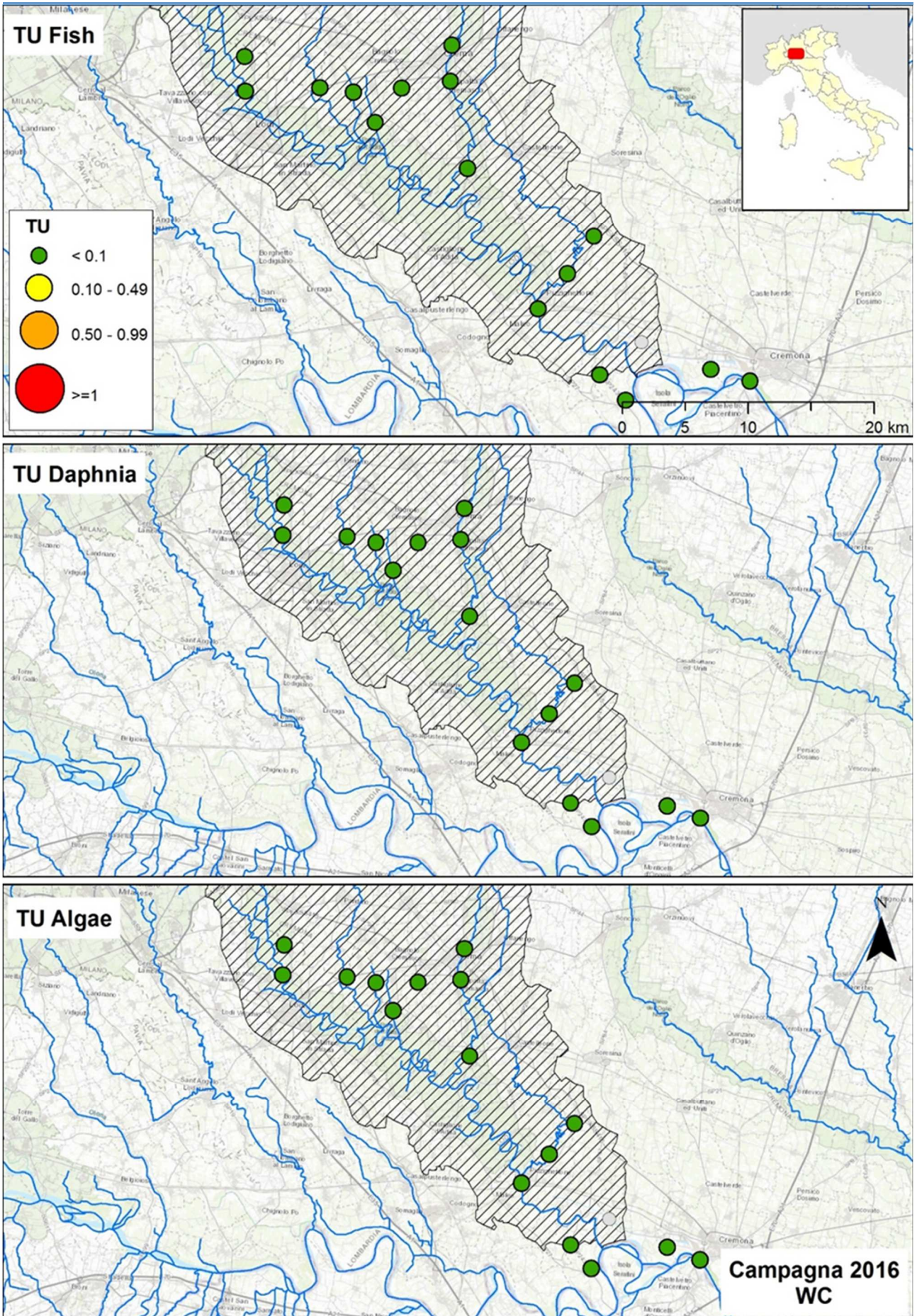


Figura 16. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2016; Worst Case (WC). Dati Tabella 9

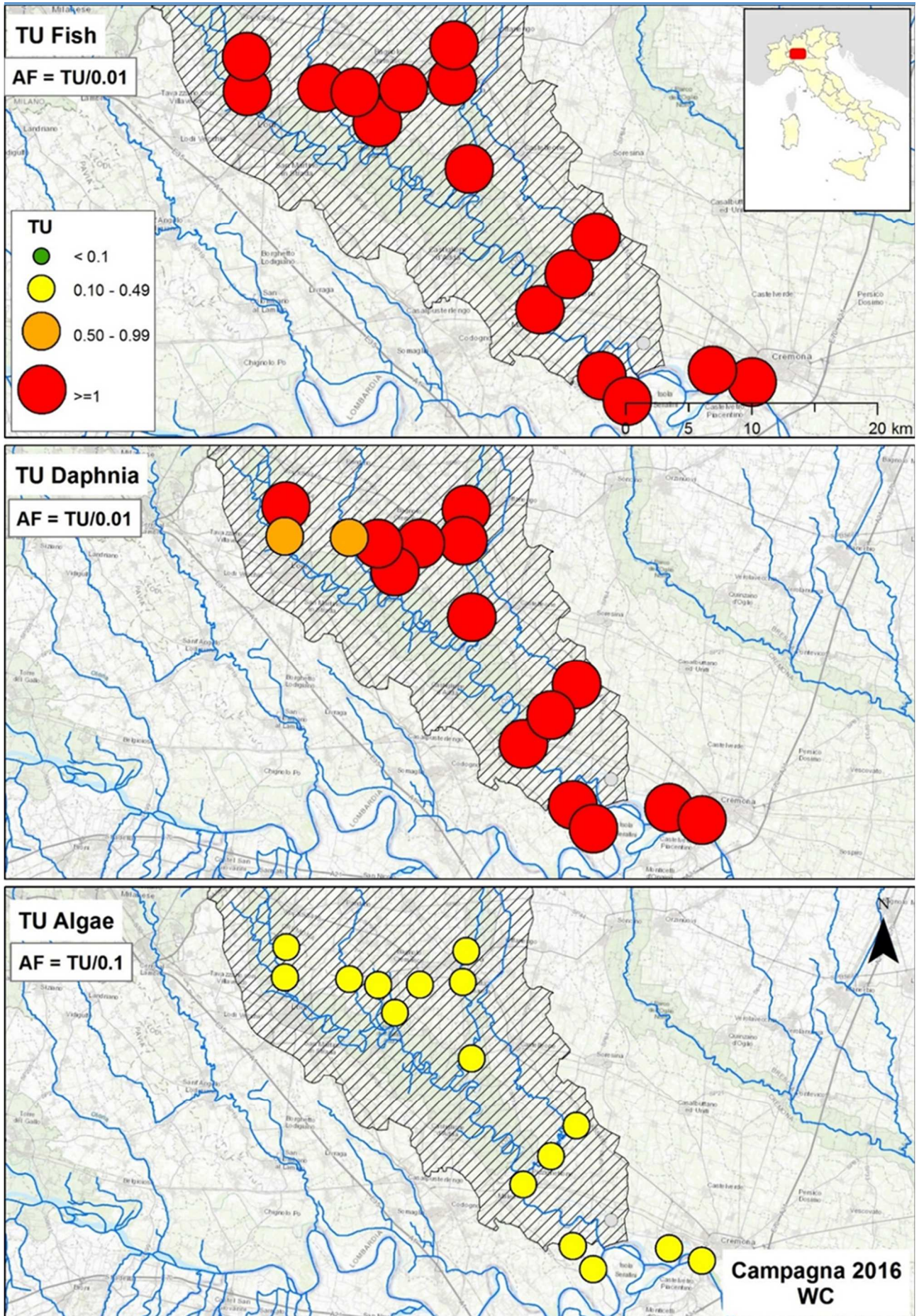


Figura 17. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2015; Worst Case (WC) con Assessment Factor (AF). Dati tabella 8 ai quali sono stati applicati gli AF.

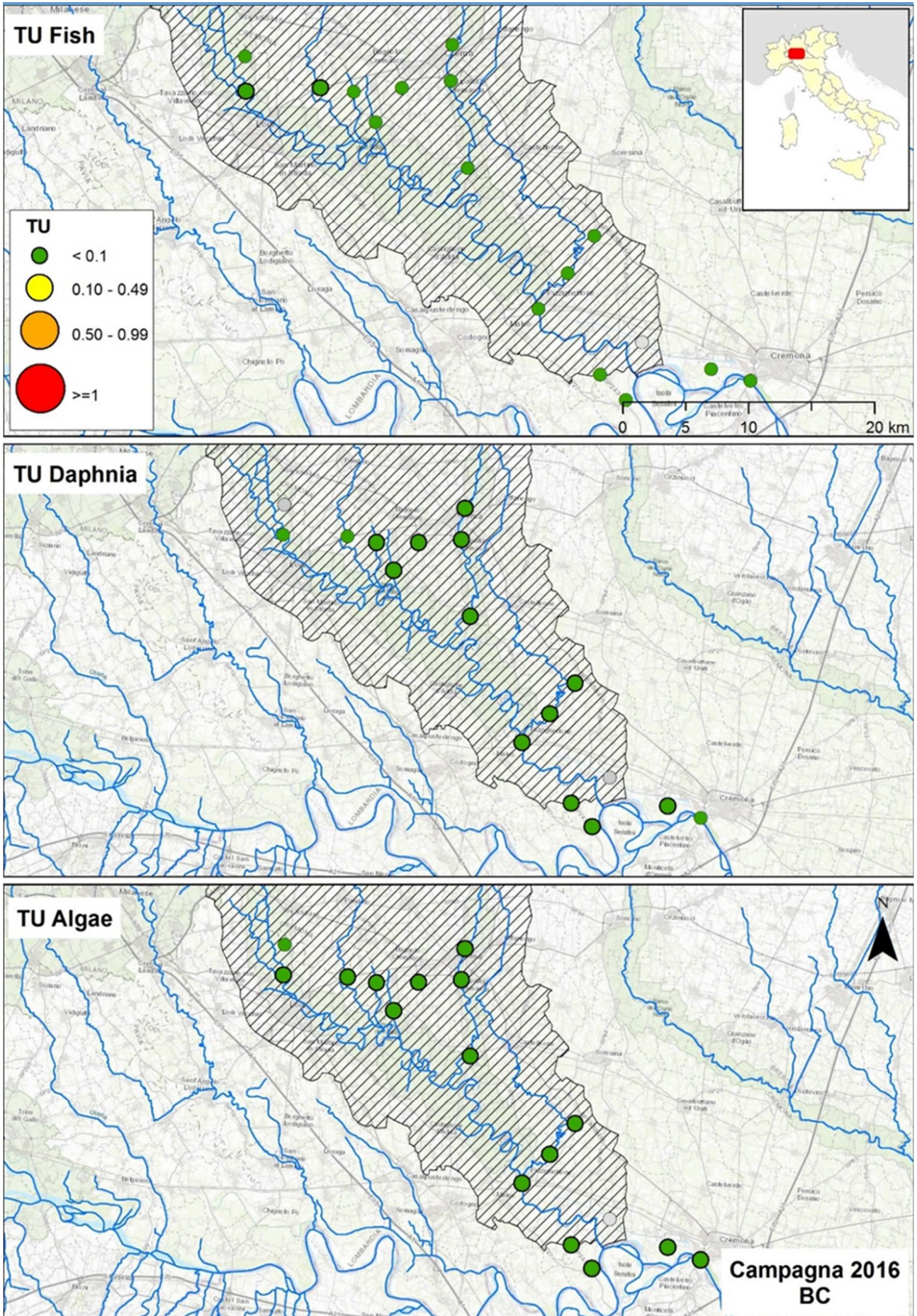


Figura 18. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2016; Best Case (BC). Dati tabella 12.

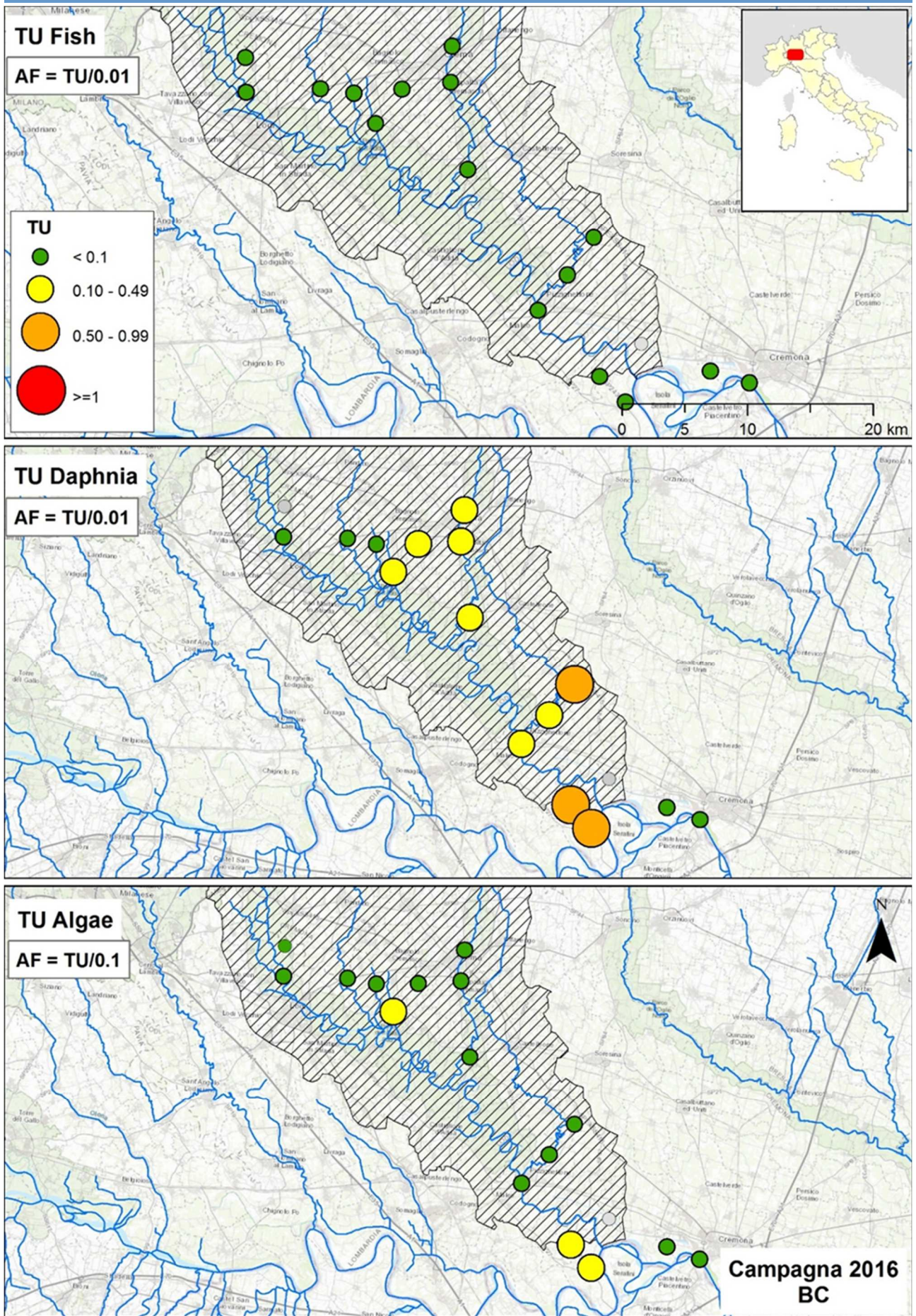


Figura 19. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2016; Best Case (BC) con Assessment Factor (AF). Dati Tabella 12 ai quali sono stati applicati gli AF.

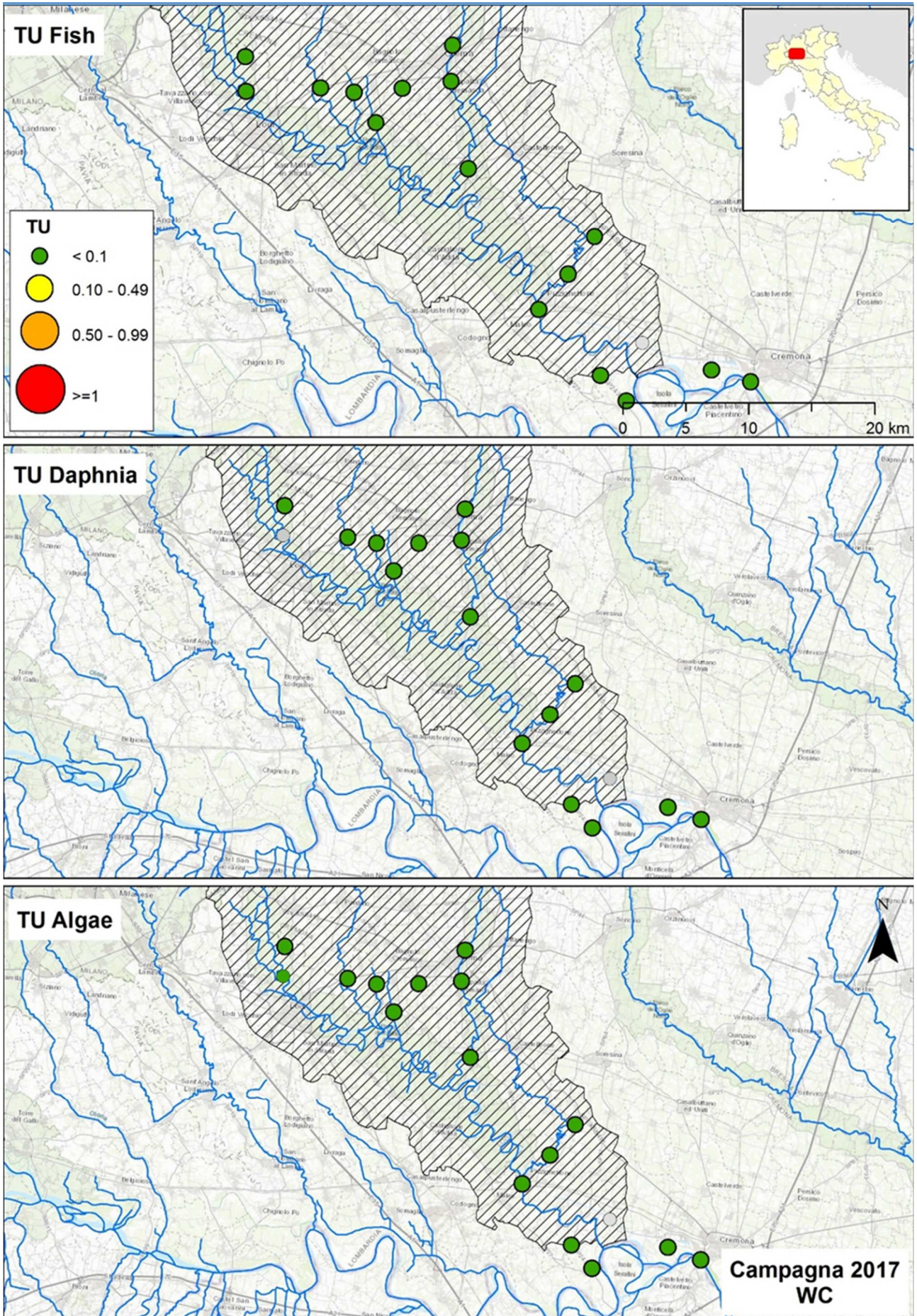


Figura 20. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2017; Worst Case (WC). Dati Tabella 10.

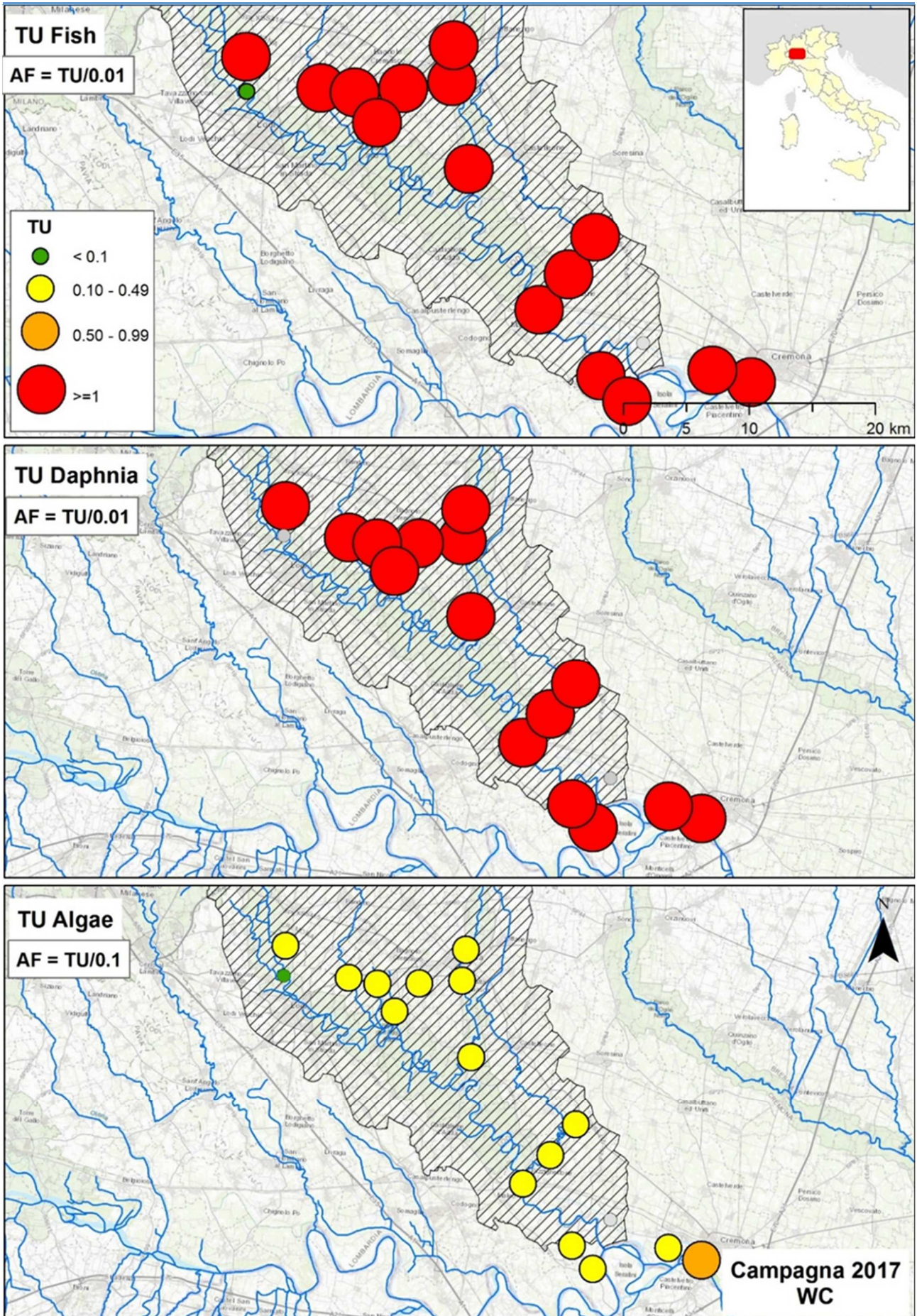


Figura 21. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2017; Worst Case (WC) con Assessment Factor (AF). Dati Tabella 10 ai quali sono stati applicati gli AF.

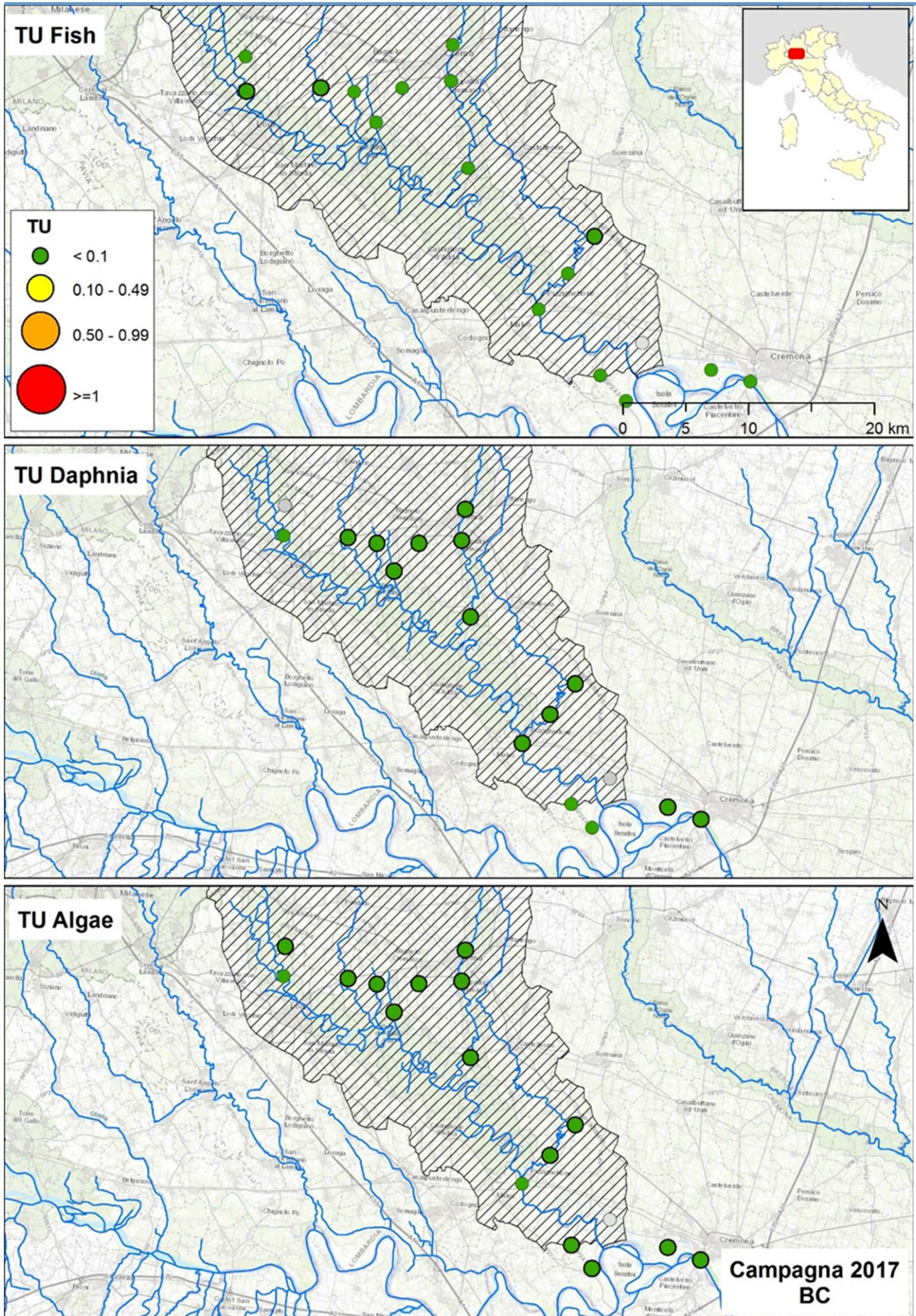


Figura 22. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2017; Best Case (BC). Dati Tabella 13.

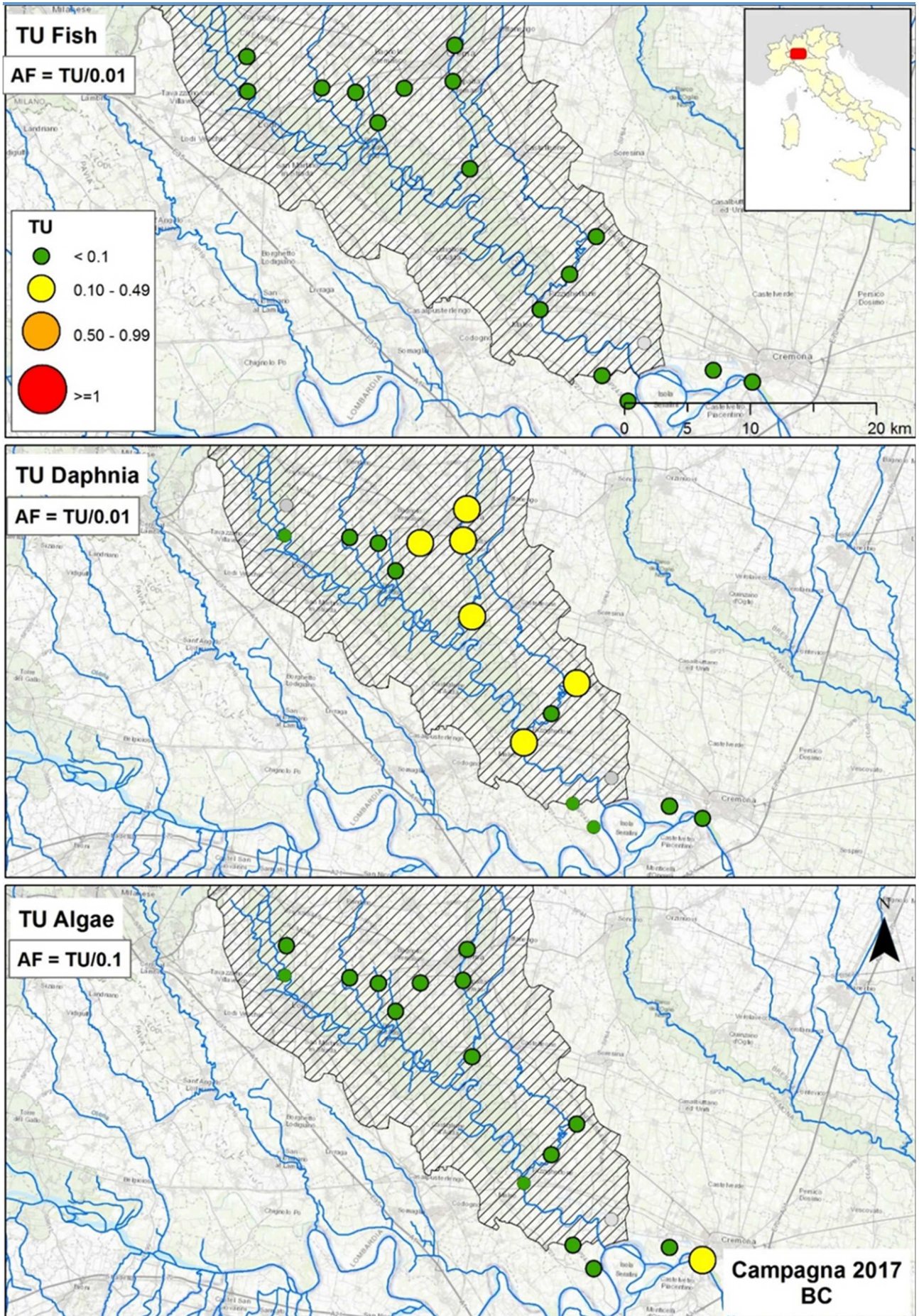


Figura 23. Carta Tematica di TU; Fiume Adda, Campagna 2017; Best Case (BC) con Assessment Factor (AF). Dati Tabella 13 ai quali sono stati applicati gli AF.

effettivamente le sostanze ricercate avevano una concentrazione LOQ molto bassa.

In definitiva, dunque, i valori di TU, nelle campagne considerate, hanno sempre valori <1. I casi in cui si supera questo limite è solo nel criterio *worst case*, in cui è stato applicato l'*Assessment factor* (Figure 13, 15, 17, 19, 21 e 23), sebbene questa condizione non si verifichi per tutti i livelli trofici (solo per pesce e dafnia, vedi Figure 13, 17 e 21). Ciò significa che solo nei casi peggiorativi si hanno valori di TU>1.

Considerazioni sui risultati ottenuti sui 5 casi di studio e sul rischio delle miscele per gli ecosistemi selezionati

L'obiettivo dell'attività era quello di applicare il modello della *Concentration addition* (CA), selezionato dopo un attento studio della letteratura internazionale, a casi di studio reali del territorio italiano, al fine di mostrarne le diverse potenzialità. Tale applicazione è stata effettuata attraverso l'elaborazione di dati di concentrazione (esposizione) di contaminanti ed effetto (ecotossicità). La principale potenzialità è stata quella di poter evidenziare la presenza di miscele prioritarie, cioè quelle miscele che possono maggiormente ricorrere nel tempo e che possono avere una potenziale effetto, situazioni sui cui eventualmente concentrare ulteriori approfondimenti. Inoltre, all'interno di queste miscele, sono evidenziabili quali siano i contaminati che maggiormente hanno un'influenza sulla potenza della miscela, per favorire una gestione delle miscele.

Sui valori di contaminazione misurati (contaminanti organici normati ed alcuni emergenti) derivati da diverse fonti di contaminazione (industriale, agricola e civile), il modello CA è stato applicato mediante un approccio teorico/empirico e sono state prodotte diverse mappe tematiche georeferenziate (circa 200). Tali mappe tematiche riportano, per ciascun livello trofico considerato (alga, dafnia e pesce) sia il risultato dell'applicazione del modello CA (dunque la potenza delle miscele, espressa come unità di tossicità, TU), sia lo stesso TU al quale sono stati applicati dei fattori di sicurezza (*Assessment factors*); questo considerando sia solo le sostanze realmente riscontrate (*best case*) che tutte le sostanze monitorate, anche se la concentrazione monitorata era <LOQ. Inoltre sono state prodotte ulteriori mappe tematiche che riportano l'influenza (in termini %) delle singole sostanze alla potenza delle miscele.

Il risultato finale, dunque, è una serie di mappe tematiche per ciascun caso di studio, considerando diversi campionamenti temporali. Nel presente articolo sono state riportate le mappe tematiche più significative relative al caso di studio Adda.

Si vuole evidenziare che per i casi di studi selezionati è stata presa in considerazione una mole di dati significativa riguardante diversi contaminanti; è stato necessario un considerevole lavoro di omogeneizzazione dei dati di concentrazione (esposizione) ed effetto (dati ecotossicologici) per la loro successiva elaborazione con il modello CA e poi per la produzione delle carte tematiche. Infatti per ogni caso di studio sono state considerate:

- quali sostanze utilizzare nel calcolo della xTU;
- i loro relativi LOQ;
- i dati di ecotossicologia ad essi associati, quando esistenti;
- gli *assessment factor* da applicare.

Le metodologie utilizzate per la gestione dei dati, nonché per la loro georeferenziazione si sono rivelate adeguate ed hanno permesso di produrre delle mappe in cui i risultati derivanti dall'elaborazione modellistica sono ben evidenti e confrontabili, all'interno dello stesso caso di studio, considerando i diversi criteri di selezione dei dati adottati (es. *Best case*, *Worst case*). Poiché in ogni caso di studio sono state incontrate diverse complessità (es. diverso numero di contaminanti analizzati, concentrazioni LOQ differenti nei diversi casi di studio e all'interno di uno stesso sito di campionamento, incompletezza di dati ecotossicologici), le mappe tematiche vanno interpretate solo considerando tutti questi aspetti, per poterne dare un giudizio sintetico. Pertanto vengono fatte delle considerazioni caso per caso:

- **Adda:** il numero di sostanze monitorate è elevato (87), ma quelle con concentrazioni >LOQ è molto limitato (max 7); le TU corrispondenti sono tutte <1 (max 0,02). Solo nei casi peggiorativi (*worst case*, *assessment factor* applicati), la TU risulta >1 per i livelli trofici alga e dafnia;
- **Scafa:** delle 34 sostanze analizzate, sono state rilevate quasi tutte (tra 28 e 32) con una concentrazione >LOQ, ma i dati della potenza delle miscele per i tre livelli trofici sono molto al di sotto di 1. È comunque da evidenziare che esistono pochi dati ecotossicologici (per 11-13 sostanze su 34 monitorate);
- **Tevere:** quasi tutte le sostanze monitorate avevano una concentrazione misurata <LOQ; il valore calcolato delle TU è molto <1 (anche con il criterio peggiorativo *worst case*). Con l'applicazione degli *Assessment factor* di questo criterio, la TU risulta con valori tra 0,5 e 1 o >1. Le miscele considerate sono costituite, in termini di tossicità relative (xTU), da poche sostanze ed in generale sono pesticidi o l'antracene;
- **Ledra:** 47 sostanze analizzate (normate ed emergenti), di cui circa la metà sono state utilizzate nel modello perché avevano anche il corrispettivo valore ecotossicologico (EC₅₀ o LC₅₀). Le TU per i tre livelli trofici era sempre <1 e solo applicando gli *assessment factors*, il valore di TU era >1, soprattutto per il livello trofico dafnia. In quest'ultimo caso sono gli erbicidi che hanno maggiormente pesato nella TU.
- **Milano:** anche in questo caso le sostanze con dato ecotossicologico erano circa la metà di quelle monitorate (mediamente 18 sostanze su 53). La TU è sempre <1 (anche per il *worst case*). Applicando gli *Assessment factors*, le TU per il livello trofico alghe sono risultati >1. La sostanza trainante sulla potenza di tossicità per il livello trofico alghe è stato il triclosan (99%).

L'applicazione del modello CA ha permesso di mostrare la sua flessibilità e potenzialità di fornire informa-

zioni utili non tanto a classificare in termini “assoluti” gli ecosistemi analizzati (ad oggi si possono considerare già validi quelli della WFD), ma ad identificare casi in cui i risultati del modello ci indicano delle possibili criticità e presenza di miscele prioritarie su cui effettuare ulteriori approfondimenti.

Considerazioni relative ai casi di studio con dati di contaminazione previsti

Il modello di additività dose/concentrazione è stato applicato nei seguenti casi studio:

- a) per la previsione di miscele di prodotti fitosanitari derivanti da una coltura agraria (mais o melo);
- b) per la previsione di miscele derivanti da impianti di depurazione (farmaci, prodotti per la cura del corpo etc.).

Indipendentemente dallo scenario (agricolo o impianti di depurazione) la metodica si è basata sull'uso di modelli previsionali del destino ambientale, in grado di stimare le potenziali concentrazioni di una sostanza nell'ambiente (PEC: *Predicted Environmental Concentration*). Nel caso dei prodotti fitosanitari si propone l'uso dei modelli FOCUS, attualmente utilizzati nelle procedure di autorizzazione al commercio di queste sostanze. Nel caso degli impianti di depurazione, si suggerisce l'uso del modello proposto da EMA (*European Medicine Agency*) per i farmaci ad uso umano. Le PEC previste dai modelli sono state successivamente rapportate a diversi *endpoint* ecotossicologici (es. PEC/LC₅₀pesci) al fine di calcolare le frazioni di Unità di Tossicità (xTU) per ciascun componente della miscela. Infine, si procede alla sommatoria delle xTU ed all'applicazione di fattori di incertezza (se necessari), in modo da calcolare la tossicità della miscela secondo il modello di additività dose/concentrazione (*concentration addition*).

L'applicazione del modello seguendo la metodologia proposta ai diversi casi studio ha permesso di valutare la sua applicabilità (inclusi i limiti) ed inoltre di osservare quanto segue:

a) prodotti fitosanitari:

- alcuni scenari agricoli italiani risultano più a rischio a causa della formazione di miscele di prodotti fitosanitari. Infatti, gli scenari di *runoff* (scorrimento superficiale) sono più frequentemente interessati dal superamento della soglia di rischio rispetto agli scenari di drenaggio;
- la composizione delle miscele varia nel tempo sia nel numero che nel rapporto di concentrazioni tra i costituenti. Inoltre, la sua pericolosità varia in funzione degli organismi considerati (alghe, dafnia, pesce);
- a seconda della coltura selezionata e della tipologia di prodotti utilizzati ci saranno dei periodi dell'anno in cui è più frequente il superamento delle soglie di rischio;
- In genere, solo una o poche sostanze determinano la tossicità della miscela. In moltissimi casi, ad esempio nel mais, i risultati hanno evidenziato che l'effetto atteso della miscela dipende esclusivamente da un insetticida organofosforico.

- Tuttavia, è da sottolineare che per queste sostanze la valutazione di rischio nelle procedure di registrazione a livello europeo ha coinvolto un *higher tier effect assessment* che ha identificato un uso sicuro. Questo approccio non è stato considerato nel presente studio.

b) Impianti di depurazione:

- Il modello EMA, utilizzato per il calcolo delle PEC, non ha una sufficiente risoluzione temporale. Infatti, contrariamente ai modelli FOCUS che restituiscono delle PEC su base giornaliera, in questo caso si ottiene un unico valore di concentrazione prevista;
- Inoltre, per la sua applicazione sono necessarie una serie di informazioni non sempre di facile reperimento (es. quantitativi di farmaci utilizzati in una determinata area). Questo, ovviamente, aumenta il grado di incertezza sui risultati ottenuti;
- Malgrado questi limiti (che possono essere superabili aumentando il grado di conoscenza dell'area oggetto di studio), l'applicazione della metodologia ha confermato quanto già emerso per i prodotti fitosanitari. Ovvero, esiste una variabilità temporale nella composizione quali-quantitativa delle miscele derivanti da impianti di trattamento delle acque ed in genere la pericolosità delle miscele dipende da una o pochissime sostanze. Nel caso specifico, l'amoxicillin è stata la sostanza che ha trainato la potenza della miscela, nel periodo invernale.

Considerazioni conclusive generali: vantaggi e limiti del modello applicato e dell'approccio di studio

La presenza di miscele complesse di composti chimici, documentata con sempre maggiore frequenza negli ambienti acquatici, richiede maggiori conoscenze per una sua corretta gestione. Ad esempio, un aspetto importante ma ancora poco analizzato, è la comprensione delle modalità con cui una miscela si origina nell'ambiente. Un approfondimento di questa tematica è assolutamente fondamentale, nell'ottica di sviluppare strumenti previsionali nell'analisi e gestione del rischio da miscele per gli ecosistemi acquatici.

Ad oggi, i dati ecotossicologici e tossicologici relativi agli effetti delle miscele sono molto limitati e, includendo anche i contaminati emergenti, le combinazioni degli effetti di diverse sostanze possono essere molteplici e difficili da stabilire a priori.

In questo contesto, nel presente studio, il modello di additività dose/concentrazione o *Concentration addition* (CA) è stato scelto per essere applicato in diversi contesti di contaminazione di acque superficiali. Il modello CA è quello internazionalmente utilizzato nella valutazione del rischio ambientale in assenza di informazioni dettagliate relative all'effetto ecotossicologico dell'intera miscela e sulle possibili interazioni (sinergiche, antagoniste ecc.) tra due o più dei suoi componenti. In tale modello si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d'azione. Infatti, la tossicità della miscela è stata calcolata diversi casi di studio ed espressa in termini di unità di

tossicità (TU, *Toxic Unit*), ovvero sommando le concentrazioni misurate (MEC) o previste (PEC) di ciascun componente della miscela, normalizzate rispetto ad un *endpoint* ecotossicologico (EC₅₀ o LC₅₀ per ciascuno degli organismi di tre livelli trofici alga, dafnia e pesce rappresentativi del comparto acquatico).

Potendo applicare il modello sia a dati ambientali di contaminazione misurati, sia a dati previsti, il modello prevede la formazione di una miscela nell'ambiente in maniera retrospettiva (teorico/empirica), utilizzando i dati di monitoraggio disponibili per la valutazione del rischio da miscela, o prospettica (teorico previsionale), utilizzando dati di contaminazione calcolati mediante modelli previsionali.

Il modello è stato applicato secondo una metodologia per prevedere ed identificare la composizione di miscele "prioritarie". Con il termine miscele prioritarie non si intende una miscela in cui, tra i componenti, siano presenti soltanto sostanze prioritarie (riportate nella Direttiva UE sulle sostanze prioritarie). Piuttosto, ci si riferisce a quelle combinazioni di sostanze che hanno un'elevata possibilità di originarsi come risultato delle emissioni dalle coltivazioni agrarie, dagli impianti di trattamento o di quelle monitorate.

Nel caso specifico qui riportato, i casi di studio ai quali il modello è stato applicato in maniera retrospettiva con dati misurati sono stati i seguenti:

- la parte terminale del bacino del fiume Adda, uno dei principali affluenti del Po; questo caso di studio aveva un numero considerevole di dati di monitoraggio (provenienti dall'ARPA Lombardia), per il quale sono state considerate 18 stazioni di campionamento su tre anni di monitoraggio (2015-2017); i dati erano quelli dell'ARPA Lombardia relativi all'autunno di ciascun anno, con diversi campionamenti;
- un tratto del fiume Tevere (da Civiltà Castellana a Roma città), con 8 stazioni (comprese in un tratto del fiume di circa 50 km); i dati utilizzati (provenienti dall'ARPA Lazio) erano su 3 anni (2015-2017), considerando i campionamenti autunnali;
- un punto specifico del fiume Tevere (Scafa) a valle dell'impianto di depurazione di Roma sud (dati su 5 campionamenti totali da letteratura da Saccà et al., 2019)⁽¹⁵⁾ su 3 anni (2013-2014-2015);
- fiume Ledra (Friuli Venezia Giulia), con 15 punti di campionamento lungo l'asta fluviale, a monte e a valle di impianti di depurazione civile; i dati (2015) sono stati tratti dalla pubblicazione Raitano et al. (2018)⁽¹⁶⁾.
- diversi dati provenienti da fiumi nell'area di Milano (7 punti specifici di Olona, Seveso e Lambro), a monte e a valle di impianti di depurazione civile. I dati sono stati tratti dalla pubblicazione Riva et al., (2019)⁽¹⁷⁾, (2 campionamenti nel 2011).

Al fine di agevolare l'applicazione del modello anche a contesti territorialmente e temporalmente ampi, è stata implementata una procedura semi-automatica di gestione dei dati e di calcolo dei valori di TU che prevede l'utilizzo di sistemi informatici di media com-

plexità (es. SQL server come base dati relazionale, Microsoft® Excel e Microsoft® Access).

Un fattore di cui si è tenuto conto è la concentrazione di monitoraggio e dei limiti di quantificazione strumentale (LOQ, non sempre uniformi nei diversi monitoraggi). In teoria, una concentrazione <LOQ potrebbe non significare assenza di concentrazione della sostanza, ma semplicemente che il metodo applicato o la strumentazione utilizzata non rilevano una determinata sostanza al di sotto di una certa concentrazione. Dunque sono state considerate anche le concentrazioni <LOQ (*worst case*). È indubbio che questo tipo di elaborazione può mostrare una situazione peggiorativa rispetto a quella reale.

Un'ulteriore considerazione è stata fatta per il "grado di incertezza" dovuto ai pochi dati ecotossicologici considerati (es. solo un valore per ciascun livello trofico) nell'elaborazione del modello applicato. Inoltre i tre organismi target potrebbero anche non essere sempre quelli più sensibili alle singole sostanze considerate, sebbene siano appartenenti a tre livelli trofici differenti e rappresentativi dell'ambiente acquatico. Per superare tale "incertezza", come comunemente previsto dalle linee guida ECHA inerenti al rischio ecotossicologico delle sostanze chimiche, sono stati anche applicati degli *assessment factors* (0,1 per i dati elaborati di tossicità della miscela riguardanti alghe e 0,01 dafnia e pesci).

A valle di una corposa elaborazione dei dati, sono state prodotte circa 200 mappe tematiche che hanno riportato la potenza della miscela.

In linea generale, sono i pesticidi che comandano la potenza della tossicità (in particolare gli erbicidi analizzati). Solo in casi sporadici, altre sostanze (diclofenac, EDDP, alcuni fenoli, l'antracene) hanno pesato sulla potenza della miscela.

I 3 casi di studio in cui il modello è stato applicato a dati di monitoraggio ambientale previsti (PECs: *Predicted Environmental Concentrations*) sono stati i seguenti:

- due scenari di colture agrarie (mais e melo)
- un impianto di depurazione (depuratore del Passo del Tonale).

Anche negli scenari colturali o dell'impianto di depurazione, sono state poche le sostanze trainanti la potenza di tossicità. Ad esempio nel caso del melo, il Captan, o il ditianon o il pendimetalin costituivano la quasi totalità della potenza della miscela. Ciò è dipen-

⁽¹⁵⁾ Saccà ML, Ferrero VEV, Loos R, Di Lenola M, Tavazzi S, Grenni P, Ademollo N, Patrolecco L, Huggett J, Barra Caracciolo A, Lettieri T, 2019. *Chemical mixtures and fluorescence in situ hybridization analysis of natural microbial community in the Tiber River. Science of the Total Environment*, 673, 7-19

⁽¹⁶⁾ Raitano G, Goi D, Pieri V, et al. (Eco)toxicological maps: A new risk assessment method integrating traditional and in silico tools and its application in the Ledra River (Italy). *Environ Int.* 2018; 119:275-286. doi:10.1016/j.envint.2018.06.035

⁽¹⁷⁾ Riva F., Zuccato E., Davoli E., Fattore E., Castiglioni S., 2019. Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy. *J. Hazard. Mater.* 361, 103-110

so anche dal fatto che questi prodotti possono avere dei periodi di applicazione differenti durante l'anno. Nel caso del mais, il Dicamba e l'MCPA erano le sostanze che in % erano preponderanti nel valore di TU. Infine, a titolo di esempio, per l'impianto di depurazione, la sostanza trainante è stata l'antibiotico amoxicillin, soprattutto nel periodo invernale. Dunque poter prevedere l'andamento annuale delle sostanze è un aspetto fondamentale.

In tutti i casi i valori di TU erano >1 solo con gli *assessment factors* applicati, quindi nei casi peggiorativi.

Dunque, in conclusione:

- il modello applicato ha avuto il vantaggio di mettere in evidenza le miscele prioritarie, ovvero le combinazioni di sostanze con elevata probabilità di ritrovarsi contemporaneamente in un corpo idrico;
- all'interno della miscela, è stato possibile identificare quale delle sostanze avesse un maggior "peso" di ecotossicità, cioè quella che risulta "trainante" nella tossicità della miscela individuata. Tale considerazione è fondamentale ai fini di una gestione delle miscele, facendo delle considerazioni specifiche su tali sostanze al fine di potere valutare quali misure di prevenzione prendere per limitarne la contaminazione in uno specifico contesto ambientale;
- solo una o pochissime sostanze contribuiscono in maniera rilevante alla tossicità di miscela. Questa indicazione offre una prospettiva differente dal punto di vista della gestione del rischio da miscela (si rimanda agli specifici capitoli per l'identificazione delle sostanze).

Mettendo in atto delle azioni volte a ridurre le concentrazioni in acqua di queste sostanze si abbasserebbe notevolmente anche il rischio della miscela.

Ovviamente sarebbero auspicabili, a valle di ogni *screening*, ulteriori approfondimenti, soprattutto per quelle miscele che mostrano una potenza di tossicità rilevante.

Il risultato finale del lavoro effettuato sui casi di studio ha contribuito, dunque a identificare quali fossero le sostanze e le loro combinazioni (miscele) che si trovano più frequentemente nell'ambiente acquatico (soprattutto per quei casi con dati a disposizione su

più anni di monitoraggio) e ad individuare sia le miscele prioritarie, che le sostanze che più influiscono sulla tossicità di insieme.

Il quadro normativo di riferimento

a cura di

Serena Santoro, *Ministero della Transizione Ecologica, Direzione Generale per il Patrimonio Naturalistico*

L'Unione europea prevede, attraverso l'applicazione del Regolamento (CE) n. 1907/2006, relativo alla registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche - "regolamento REACH", un sistema integrato per garantire la conoscenza delle proprietà delle sostanze immesse sul mercato, per valutarne i rischi, assicurandone il controllo e la corretta gestione e promuovendo la sostituzione delle sostanze che destano maggiore preoccupazione per l'ambiente e per la salute umana.

Le disposizioni previste dal regolamento REACH riguardano la singola sostanza in quanto tale o contenuta in una miscela o in un articolo (prodotto). Attraverso le procedure di autorizzazione e restrizione il regolamento REACH stabilisce limiti per ciascuna sostanza chimica, ma non prevede la valutazione degli effetti associati alla combinazione di più sostanze.

La sola analisi delle singole sostanze chimiche potrebbe non garantire una sufficiente sicurezza per quanto riguarda la tutela della salute umana e dell'ambiente. L'uomo e l'ambiente possono infatti essere esposti a diverse sostanze chimiche provenienti da molteplici fonti.

Risulta pertanto prioritario affrontare i potenziali effetti combinati delle miscele non intenzionali di sostanze chimiche in modo sistematico⁽¹⁾. Nell'ambito del regolamento REACH sono stati compiuti alcuni progressi: è stata infatti adottata nel 2018 una restrizione per quattro ftalati (DEHP, DIBP, DBP e BBP) presenti negli articoli messi a disposizione del pubblico, che tiene in considerazione anche gli effetti combinati delle quattro sostanze. La restrizione riguarda sia l'immissione sul mercato di articoli contenenti ciascun singolo ftalato, sia qualsiasi combinazione di questi ftalati nei materiali plastificati (Regolamento UE 2018/2005).

L'importanza della valutazione degli effetti combinati è stata ribadita anche dal Consiglio dei Ministri dell'ambiente europei nelle Conclusioni adottate il 26 giugno 2019 "Verso una strategia dell'Unione per una politica sostenibile in materia di sostanze chimiche", in cui la Commissione europea era stata invitata a presentare proposte per introdurre nella normativa dell'UE requisiti specifici per garantire che gli effetti combinati delle miscele non intenzionali fossero affrontati in modo adeguato e coerente.

Le istituzioni europee e nazionali, nonché il mondo della ricerca, hanno avviato diverse azioni per individuare un approccio armonizzato alla gestione degli effetti combinati delle miscele non intenzionali. Il 14 ottobre 2020, la Commissione europea ha presentato

la "Strategia in materia di sostanze chimiche per la sostenibilità - Verso un ambiente privo di sostanze tossiche" (COM 2020 667 final). Tale strategia, pubblicata a distanza di quasi venti anni dalla prima, traccia una visione a lungo termine che mira, in linea con quanto previsto dal Green Deal, ad azzerare l'inquinamento e a raggiungere l'obiettivo di produrre e utilizzare le sostanze chimiche in modo sostenibile.

La Strategia prevede, tra l'altro, azioni volte alla valutazione e gestione degli effetti combinati delle miscele di sostanze: la Commissione europea intende, entro il 2022, avviare un processo per valutare come introdurre nel regolamento REACH, per ciascuna sostanza, dei fattori di correzione specifici (*Mixture Assessment Factors*) che tengano conto dei potenziali effetti additivi o sinergici delle sostanze. I possibili impatti di tale approccio dovranno essere attentamente valutati, anche sulla base di una rigorosa analisi delle conoscenze scientifiche e delle informazioni attualmente disponibili. Inoltre, nell'ambito della Strategia sopra citata, è prevista entro il 2022 l'introduzione di disposizioni che tengano conto degli effetti combinati non solo nel regolamento REACH ma anche in altre norme come ad esempio la legislazione sulle acque e le normative riguardanti i giocattoli, i materiali a contatto con gli alimenti, i detersivi e i cosmetici, così da adottare un approccio trasversale nella legislazione europea.

L'importanza di definire al più presto una legislazione armonizzata sugli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche è stata sottolineata dal Consiglio dei Ministri dell'ambiente europei nelle Conclusioni "Strategia dell'Unione in materia di sostanze chimiche sostenibili: è il momento di agire", adottate il 15 marzo 2021.

⁽¹⁾ *Miscela non intenzionale: "miscela di sostanze chimiche presente nelle matrici ambientali (aria, acqua, suolo) o nell'uomo come risultato di rilasci da diverse fonti e attraverso molteplici vie di esposizione"*

Le miscele nelle linee guida per la valutazione di impatto sanitario: aspetti tossicologici ed ecotossicologici

a cura di

Mario Carere (*), Emanuela Testai, *Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Salute*

RIASSUNTO

La Valutazione di Impatto Sanitario (VIS) è una procedura finalizzata a tutelare la salute delle popolazioni esposte agli impatti che piani/programmi/opere possono determinare nel territorio interessato. Tali piani, per esempio la revisione di una raffineria o impianto di combustione, possono comportare il rilascio e l'immissione negli ecosistemi di molteplici contaminanti e la valutazione complessiva dell'impatto sanitario dell'opera può acquistare complessità nel caso frequente che essa comporti l'esposizione contemporanea della popolazione a miscele. La linea guida VIS dell'Istituto Superiore di Sanità pubblicata nel 2019 ha previsto una procedura specifica per fronteggiare il tema delle miscele, essa include aspetti tossicologici ed ecotossicologici che sono descritti in dettaglio in questo articolo .

SUMMARY

The health impact assessment (HIA) is a procedure that has the aim to protect the health of the populations exposed to the impacts of plans/programmes/works. These plans, for example the update of a refinery or combustion plant, can generate the release and emissions in the ecosystems of multiple contaminants and the health impact assessment can be complex in the frequent scenario in which a multiple exposure of the population to the mixtures is predicted. The Italian Institute of Health HIA guideline published in 2019 has foreseen a specific procedure to face the issue of the mixtures that includes toxicological and ecotoxicological aspects that are described in detail in this article .

1. INTRODUZIONE

La Valutazione di Impatto Sanitario (VIS) è una procedura finalizzata a tutelare la salute delle popolazioni esposte agli impatti che piani/programmi/opere possono determinare nel territorio interessato. La Direttiva europea 2014/52/UE concernente la valutazione dell'impatto ambientale di specifici progetti pubblici e privati presenta una grande novità includendo in modo esplicito *"population and human health"* nella lista degli aspetti che devono essere considerati. Il DL.vo 104/2017 ha recepito la Direttiva europea 2014/52/UE sulla Valutazione di Impatto Ambientale (VIA), prescrivendo per i nuovi impianti che rientrano in una specifica categoria (es. grandi impianti di combustione, raffinerie) di svolgere una VIS al fine di tutelare la salute delle popolazioni residenti sul territorio e quindi potenzialmente esposte a vari fattori di rischio.

Per la VIS si tratta di condurre una attività predittiva (come misura di prevenzione primaria) per valutare i rischi potenziali associati ad un'opera non ancora presente sul territorio. Tuttavia le stesse metodologie possono essere utilizzate per identificare fattori di rischio e valutare l'impatto sulla salute di opere già esistenti. Nel 2019, su mandato del Ministero della Salute, l'ISS ha pubblicato le "linee guida per la valutazione di impatto sanitario" le cui fasi fondamentali sono le seguenti:

Scoping: Quali sono i dati disponibili? Qual è area interessata? Quali sono i potenziali impatti sulla salute e gli indicatori di salute (integrazione di metodolo-

gie tossicologiche, epidemiologiche ed ecotossicologiche)?

Assessment: qual è la valutazione e la quantificazione degli impatti sulla salute identificati durante lo *scoping*? Quali sono le incertezze?

Monitoring: dato il significato previsionale della fase precedente il monitoraggio verifica che tali previsioni siano rispettate (ambientale: esposizione esterna; ecotossicologico; biomonitoraggio: esposizione interna; stato di salute con metodologie epidemiologiche)

Reporting: la stesura del rapporto deve riportare tutte le attività condotte e il percorso logico utilizzato durante la valutazione

Poiché tali impianti possono comportare il rilascio e l'immissione negli ecosistemi di molteplici contaminanti la valutazione complessiva dell'impatto sanitario dell'opera può acquistare complessità nel caso frequente che essa comporti l'esposizione contemporanea della popolazione a più contaminanti e quindi a miscele.

2. ASPETTI TOSSICOLOGICI

Per gli aspetti di tossicologia umana nelle linee guida VIS si è tenuto conto degli approcci consolidati adottati dal WHO e dai Comitati Scientifici della DG Sante (2013) e dai recenti documenti EFSA (2019) che mettono a disposizione metodologie e strumenti per valutare l'esposizione congiunta a più sostanze chimiche e sui rischi associati sia per sostanze chimiche non genotossiche (con un meccanismo a soglia) sia

* mario.carere@iss.it

per la valutazione della genotossicità delle sostanze presenti nelle miscele chimiche.

Per stimare i rischi associati all'esposizione a più sostanze chimiche, i metodi sostanzialmente si avvalgono degli stessi principi attraverso i quali si valutano i rischi associati ad una singola sostanza. Ciononostante, le variazioni quali/quantitative delle 'miscele' di origine ambientale che implicano caratteristiche di composizione non costante nel tempo, evidenziano la difficoltà di saggiare direttamente gli effetti di tutte le possibili combinazioni di xenobiotici in miscela, considerando ciascuna miscela come un singolo fattore di rischio.

L'alternativa è quella di utilizzare quello che viene indicato come il '*component based approach*' che si avvale della conoscenza delle proprietà tossicologiche delle sostanze oggetto dell'esposizione combinata.

Nel caso di esposizione multipla a più sostanze tossiche le ipotesi più comuni sulla tossicità combinata sono l'additività di dose, l'additività di risposta e l'interazione, in dipendenza delle conoscenze disponibili e del Meccanismo di azione delle sostanze.

Con il termine additività di dose si intende che i singoli componenti della miscela hanno una tossicità simile (es: stesso bersaglio, stessa modalità di azione o MoA-*Mode of Action*) e le dosi vengono combinate come se i diversi componenti si comportassero come diluizioni diverse della stessa sostanza producendo il medesimo effetto.

L'additività di risposta si applica invece a singoli componenti che abbiano effetti sullo stesso bersaglio, ma attraverso meccanismi indipendenti, ma il suo utilizzo in ambito di salute umana ed animale è poco frequente.

Nel caso in cui si verifichi una deviazione rispetto all'additività di dose siamo in presenza di interazioni tra sostanze come la sinergia (la risposta è maggiore di quella prevista dell'additività) e l'antagonismo (la risposta è minore di quella prevista dell'additività).

Poiché alcuni studi hanno indicato che a concentrazioni dei singoli componenti di una miscela, tipiche dei livelli ambientali, generalmente inferiori al valore soglia (es: NOAEL o *No Observed Adverse Effect Level*), le interazioni sono assenti o trascurabili, l'additività di dose è considerato come l'approccio di riferimento (o default) a gruppi di sostanze che abbiano caratteristiche simili. L'attività di *grouping*, in base alla quale si applica il concetto di additività è quindi di fondamentale importanza e a questo proposito sono disponibili documenti su come effettuarla adottati dall'OECD, da ECHA ed è in uscita un documento specifico da parte di EFSA. Infatti sostanze le cui proprietà fisico-chimiche e/o tossicologiche è probabile che abbiano una attività simile e per questo possono essere considerate un gruppo o una "categoria" di sostanze.

I metodi che applicano l'additività di dose e che sono più frequentemente utilizzati sono il *Relative Potency Factor* (RPF), il *Toxic Equivalent Factor* (TEF) e l'*Hazard Index* (HI).

I primi due approcci sono simili e si basano sullo stesso principio: uno dei componenti del gruppo omoge-

neo di sostanze con bersaglio e meccanismo simile viene utilizzato come composto di riferimento (o indice). Generalmente si sceglie quello con il profilo tossicologico più studiato (per avere una curva dose-risposta disponibile) la cui azione è considerata pari a 1: il valore di TEF o RPF degli altri componenti è stimato per confronto con quello della sostanza di riferimento e la tossicità della miscela si ottiene sommando i prodotti ottenuti moltiplicando i TEF/RPF relativi a ciascun componente per la concentrazione del componente stesso. Questi modelli sono generalmente validi, ma la loro predittività dipende fortemente dall'*end-point* considerato e dalla metodologia con cui è stato determinato.

Quando non sono disponibili dati meccanicistici sufficienti all'applicazione di TEF o RPF è possibile applicare il modello dell'*Hazard Index* (HI), un numero adimensionale, che fornisce un'indicazione numerica del grado di rischio dovuto a esposizioni combinate. L'HI si ottiene sommando i rapporti tra la concentrazione del singolo componente nella miscela e i rispettivi valori di riferimento (es: ADI, RfD) di ciascun componente, che rappresentano la potenza relativa. Valori di HI >1 possono dare indicazioni della necessità di un '*refinement*' dell'approccio o della potenziale presenza di componenti che interagiscono tra di loro.

L'HI è fortemente affetto da incertezze: infatti calcolo prevede l'uso di valori di riferimento (ADI, TDI) che al loro interno già contengono fattori di incertezza, che vengono combinati tra loro, amplificandoli.

Nel caso di esposizione congiunta a più cancerogeni genotossici, può essere calcolato il margine di esposizione totale (MoE_T), come il reciproco della somma dei reciproci dei MoE delle singole sostanze. Un MoE_T > 10.000 indica una situazione di rischio tollerabile o con bassa priorità per interventi correttivi.

L'additività di dose non si usa se esistono evidenze o ipotesi di interazione, che richiedono una valutazione specifica caso per caso. I meccanismi alla base di sinergismo e antagonismo sono complessi, ma i più frequenti riguardano gli aspetti di cinetica della sostanza all'interno dell'organismo cinetica. Questo può infatti verificarsi quando una sostanza aumenti o riduca l'assorbimento o la biotrasformazione di una seconda sostanza, cambiando la sua dose interna, se i due componenti (o molti di essi) utilizzano gli stessi trasportatori di membrana o sono metabolizzati dagli stessi enzimi, con potenziale competizione; analogamente uno o più componenti possono agire modificando meccanismi di protezione cellulare o di riparazione cellulare (inclusa la riparazione del DNA). Se vi sono prove di tali interazioni, è necessario raccogliere i dati relativi, in per tenerne conto nella valutazione del rischio, con un approccio caso-per-caso.

3. ASPETTI ECOTOSSICOLOGICI

Come raccomandato negli obiettivi strategici di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite, nel piano di azione europeo ambiente e nell'ambito dell'agenda strategica di ricerca europea (Horizon 2020) è necessario adottare un approccio di prevenzione che si basi sulla conoscenza e lo studio degli ecosistemi nella loro globalità. Le legislazioni ambientali includono spesso solo una piccola frazione delle sostanze chimiche

presenti realmente scaricate ed immesse nell'ambiente, la maggior parte delle sostanze attualmente in uso non sono incluse, di conseguenza gli effetti avversi sono spesso inesplorati. La presenza di molteplici contaminanti chimici, inclusi prodotti di trasformazione, metaboliti, sottoprodotti rende necessario un approccio di monitoraggio che sia di supporto all'analisi chimica e basato sullo studio dell'ecotossicità.

In tale contesto il ruolo dell'ecotossicologia diventa centrale per la gestione e la comprensione di potenziali effetti avversi derivanti dall'esposizione multipla a contaminanti considerati emergenti. La VIS prevede quindi anche una procedura ecotossicologica, da applicare nelle fasi di *scoping* e *monitoring*, tale applicazione fornisce un elemento di garanzia ulteriore in particolare nella fase di «*monitoring*» dove l'utilizzo di saggi ecotossicologici negli ecosistemi rappresenta un utile sistema di allerta per prevenire effetti causati da miscele (complesse o con stesso MoA) sull'ambiente e indirettamente sulla salute umana. Gli effetti rilevati negli ecosistemi (es. genotossici, embriotossici, neurotossici) possono poi a volte manifestarsi anche nell'uomo. Gli obiettivi di questa indagine sono quindi sia di «*screening*» attraverso la rilevazione di effetti avversi che possono in seguito essere approfonditi e studiati con maggior dettaglio, sia di «*early warning*» rilevando quindi precocemente dei segnali che possono in seguito rappresentare effetti importanti anche per l'uomo.

L'Ecotossicologia si sta evolvendo negli ultimi anni in maniera rapida, includendo l'uso di saggi bioanalitici (ad esempio con colture cellulari) per poter rilevare gli effetti delle sostanze chimiche in alcuni casi anche a concentrazioni più basse dei metodi di rilevanza chimici analitici (Kunz, 2014) ed anche per poter essere sempre più conformi al principio delle 3R (*Replacement, reduction, refinement*) in relazione al benessere degli animali. Attraverso test ecotossicologici moderni si possono identificare e rilevare i *Mode of Action* (MoA) delle sostanze chimiche più rilevanti per l'ambiente (es. neurotossicità, genotossicità, cardiotoxicità) in modo da coprire la gran parte degli effetti avversi presenti compresi quelli delle miscele sia complesse sia di sostanze con stesso MoA. È chiaro che per raggiungere tale obiettivo è anche necessario individuare dei criteri di valutazione e dei limiti soglia per poter discriminare lo stato di qualità di un sito.

I metodi ecotossicologici sono molteplici ed una selezione di quelli più idonei può essere svolta in base all'analisi delle pressioni presenti, delle possibili fonti di inquinamento ed anche della geografia del luogo. Tali aspetti sono stati evidenziati anche nell'ambito di un recente documento tecnico europeo elaborato nel contesto della strategia di implementazione della Direttiva Quadro Acque, in tale documento l'utilizzo di saggi *in vivo*, *in vitro* e l'uso di *biomarkers* negli ecosistemi viene raccomandato da un gruppo di esperti di diversi stati europei. Il report divide tali metodi in tre grandi gruppi:

- **Saggi Biologici In Vivo:** studio degli effetti delle sostanze chimiche su organismi viventi in studi di

laboratorio (es. alghe, crostacei, embrioni di pesce).

- **Saggi Biologici in Vitro:** Studi degli effetti delle sostanze chimiche effettuati su colture cellulari o batteriche (es. test di Ames, test luciferasi)
- **Biomarkers:** Studi su biomarcatori in organismi nativi e/o stabulati (es. metallotionine, imposex, micronuclei di eritrociti)

L'indagine eco tossicologica nella VIS dovrebbe prevedere una scelta appropriata e sito specifica di test (almeno su tre livelli trofici) comprendenti saggi di ecotossicità acuta/cronica e saggi di ecogenotossicità sia per gli ambienti acquatici che terrestri impattati, anche *biomarker* o saggi *in vitro* potrebbero essere utilizzati. La scelta dei saggi da applicare dovrebbe essere effettuata sia sulla base di informazioni riguardanti l'ecosistema in cui verrà realizzata l'opera (ambiente naturale, ambiente costruito, tipologia dei corpi idrici, ecosistemi acquatici o terrestri) sia sulla base della tipologia di ciclo industriale e potenziali inquinanti emessi. I test dovrebbero essere condotti secondo linee-guida nazionali, internazionali o tramite protocolli convalidati. Per quanto riguarda i saggi di eco-genotossicità l'individuazione di segnali precoci di contaminazione con studi sugli effetti sul DNA (causati da agenti mutageni), prima che ci sia un impatto sugli ecosistemi e sulla salute umana è estremamente rilevante; tra gli esempi di test applicabili vi è il «*comet assay*» il test di Ames ed il saggio sui micronuclei.

La linea guida prevede che sulla base dei risultati ottenuti attraverso l'indagine ecotossicologica, a titolo esemplificativo, si possono verificare diverse situazioni: 1) nessuna presenza di ecotossicità e ecogenotossicità e quindi nessun avviso di allerta per la VIS; 2) ecotossicità o ecogenotossicità rilevata: necessità di integrare nell'ambito della VIS le informazioni acquisite o investigare con maggior dettaglio gli inquinanti emessi; in caso di ecotossicità acuta il livello di allerta è maggiore; 3) ecotossicità ed ecogenotossicità rilevata: fase di massima allerta, necessità di messa a punto/rimodulazione di misure di riduzione del rischio adeguate. Le valutazioni possono variare in merito alle situazioni specifiche locali e/o sulla base di ulteriori informazioni presenti nel sito.

Il monitoraggio eco tossicologico degli impatti stimati in fase di VIS si rende necessario proprio per il significato previsionale che hanno queste valutazioni. Il monitoraggio è finalizzato ad assicurare il controllo degli effetti significativi sull'ambiente derivanti dalla realizzazione e funzionamento dell'opera per i quali è stata stabilita una potenziale relazione con effetti sanitari. L'obiettivo dell'azione di monitoraggio sarà anche quella di segnalare tempestivamente un'indesiderata evoluzione di effetti non previsti o previsti con caratteristiche diverse.

Questo monitoraggio, predisposto in accordo con gli enti locali, sarà definito tenendo conto dei risultati ottenuti nella fase di *scoping*, che rappresenteranno il valore di riferimento (punto 0) precedente alla realizzazione dell'opera. Nella fase di *scoping* sarà anche molto importante che il proponente possa descrivere lo stato di qualità ambientale delle matrici potenzial-

mente influenzate dall'impatto dell'opera; ad esempio per quanto riguarda la qualità dei corpi idrici superficiali sarà estremamente importante conoscere quale è lo stato di qualità chimico che viene rilevato attraverso i monitoraggi istituzionali (es. analisi delle sostanze prioritarie ai sensi della Direttiva Quadro Acque). È importante affermare che da quando la linea guida è stata pubblicata diversi proponenti hanno iniziato a proporre saggi ecotossicologici tenendo conto delle indicazioni fornite, tuttavia sarà necessario in futuro elaborare una specifica linea guida su tali aspetti al fine di poter fornire elementi di maggior chiarezza tali da garantire una sempre maggior efficacia nel rilevamento degli effetti di sostanze chimiche nell'ambiente.

3. CONCLUSIONI

Le linee guida sulla valutazione di impatto sanitario si basano su criteri e metodologie scientifiche consolidate che hanno l'obiettivo di prevenire rischi diretti e indiretti per la salute umana. Nell'ambito di tali metodologie l'aspetto degli effetti combinati delle miscele rappresenta un elemento rilevante in quanto gli impianti che vengono valutati possono emettere e rilasciare molteplici sostanze chimiche che si possono formare nell'ambito dei cicli industriali. La presenza di miscele di contaminanti è ormai la situazione più ricorrente nelle indagini ambientali e lo studio dell'effetto cocktail è un concetto centrale nella prevenzione della salute dell'uomo che risulta esposto a sostanze chimiche da molteplici fonti.

Gli aspetti tossicologici delle miscele sono trattati tenendo conto dei più recenti documenti adottati a livello internazionale e hanno l'obiettivo di prevenire il rischio per la salute umana dagli effetti combinati delle sostanze chimiche. L'ecotossicologia connette gli aspetti sanitari con quelli ambientali (già considerati dalla VIA) e fornisce un elemento di garanzia ulteriore in particolare nella fase di «*monitoring*» dove l'utilizzo di saggi ecotossicologici negli ecosistemi rappresenta un utile sistema di allerta per prevenire effetti sull'ambiente e sulla salute umana.

Riferimenti bibliografici

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2018. Framework for assessing health impacts of multiple chemicals and other stressors (update). Available online: <https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip-ga/ipga.pdf>
- Brack W, Dulio V, Ågerstrand M. Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment* 2017;576:720-37
- Brack W, Ait-Aissa S, Backhaus T, Dulio V, Escher BI, Faust M et al. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environ Sci Eur.* 2019;31:10. doi: 10.1186/s12302-019-0192-2
- Dogliotti E, Achene L, Beccaloni E, Carere M, Comba P, Crebelli R, Lacchetti I, Pasetto R, Soggiu ME, Testai E. Linee guida per la valutazione di impatto sanitario (DL.vo 104/2017). Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2019. (Rapporti ISTISAN 19/9).
- ECHA, Grouping-of-substances-and-read-across <https://echa.europa.eu/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/grouping-of-substances-and-read-across>
- EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Hall-dorsson T, Jeger MJ, Knutsen HK, More S, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Schlatter JR, Silano V, Solecki R, Turck D, Younes M, Benfenati E, Castle L, Hougaard Bennekou S, Laskowski R, Leblanc JC, Kortenkamp A, Ragas A, Posthuma L, Svendsen C, Testai E, Tarazona J, Dujardin B, Kass GEN, Manini P, Dorne JL, Hogstrand C. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal* 2019;17(3):5634, 77 pp.
- Kunz P, Kienle C, Carere M, Homazava N, Kase R. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J Pharm Biomed Anal* 2015;106:107-15.
- OECD GUIDANCE ON GROUPING OF CHEMICALS, SECOND EDITION Series on Testing & Assessment No. 194 (2014)
- Scientific Committee on Health and Environmental Risks; Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks; Scientific Committee on Consumer Safety. Toxicity and assessment of chemical mixtures. Brussels: European Union; 2012.
- Wernersson A.S. et al. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe.* 2015. 27:7.
- WHO (World Health Organization), 2009. Assessment of combined exposures to multiples chemicals: report of a WHO/IPCS International Workshop. Available online: <http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/workshopreportdocument7.pdf>

Materiali di riferimento composti da miscele di sostanze emergenti a supporto dei metodi ecotossicologici (EBM) per la classificazione delle acque superficiali

a cura di

Stefania Balzamo, Sabrina Barbizzi, Carlotta Ascenzi, Paolo de Zorzi, Monica Potalivo (*), ISPRA, Centro Nazionale per la rete Nazionale dei Laboratori

RIASSUNTO

Il destino delle sostanze chimiche nell'ambiente e la loro biodisponibilità influenza il rischio di contaminazione delle acque e il conseguente trasporto nella catena alimentare fino all'uomo. La valutazione della loro presenza è necessaria per definire lo stato chimico e quello ecologico delle acque secondo la Direttiva 2000/60/CE.

La presenza di un numero sempre maggiore di sostanze da monitorare e la conseguente presenza riscontrata nei corpi idrici richiede l'attenta e ragionata progettazione del monitoraggio, oltre alla sua corretta esecuzione.

Nel presente lavoro vengono descritte alcune esperienze del Centro Nazionale per la rete nazionale dei laboratori dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) condotte negli ultimi anni insieme al *Joint Research Centre* (VA) e all'interno di un progetto europeo che vede la partecipazione degli Istituti Metrologici Nazionali (IMN) di Francia, Germania e Turchia .

SUMMARY

Many chemical substances can be found in European freshwater and they can reach the trophic chain. The Directive 2000/60/CE asks to the Member States to evaluate their presence in water in order to define the chemical and ecological status of the rivers, lakes and coastal waters. Moreover these substances are bioactive at very low concentrations, so it is a great challenge to design a correct monitoring plan.

In the present work the experiences of the National Centre of the Italian laboratory network of Italian Institute for Environmental Protection and Research (ISPRA) carried out in the last years together with Joint Research Centre (VA) and some National Metrological Institutes of France, Germany and Turkey are presented .

1. INTRODUZIONE

Il destino delle sostanze chimiche nell'ambiente e la loro biodisponibilità influenza il rischio di contaminazione delle acque e il loro conseguente inserimento nella catena alimentare fino all'uomo. Per tale motivo è necessario valutarne la loro presenza anche al fine di definire lo stato chimico ed ecologico delle acque come richiesto dalla Direttiva Quadro Acque (DQA/WFD).

La presenza di un numero sempre maggiore di sostanze che derivano da attività antropiche riscontrata nei corpi idrici richiede l'attenta e ragionata progettazione del monitoraggio, oltre alla sua corretta esecuzione. Inoltre, poiché la ricerca in ogni campione di un elevato numero di sostanze diverse costituisce un impegno analitico gravoso, è necessario affrontare il problema da più angolazioni: i) la disponibilità di Materiali di Riferimento Certificati sia per le singole sostanze che per le miscele da utilizzare nelle determinazioni analitiche per garantire la riferibilità dei dati e assicurarne la qualità; ii) la disponibilità di confronti interlaboratorio per dimostrare le competenze del laboratorio che esegue le misure e iii) l'uso di metodi ecotossicologici sensibili e speditivi per il monitoraggio di sostanze prioritarie o loro miscele nelle acque superficiali.

Nel presente lavoro vengono descritte alcune espe-

rienze del Centro Nazionale per la rete nazionale dei laboratori dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) condotte negli ultimi anni insieme al Sistema Nazionale della Protezione dell'Ambiente (SNPA) e all'interno di un progetto europeo che vede la partecipazione degli Istituti Metrologici Nazionali (IMN) di Francia, Finlandia, Turchia, Germania e Slovenia per assicurare la qualità dei dati prodotti durante i monitoraggi condotti sui corpi idrici italiani e lo sviluppo di ricerche sulle miscele di sostanze emergenti per migliorarne e semplificarne le capacità di rilevamento [1,2,3].

In particolare, quest'ultimo progetto dal titolo "*Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive*" (JRP n 1.1 - EDC-WFD), finanziato dal programma EMPIR, è finalizzato alla validazione di metodi chimici ed ecotossicologici per la determinazione di miscele di ormoni nelle acque e la produzione di Materiali di Riferimento Certificati per la determinazione in matrice di queste miscele al fine di garantire la riferibilità di queste misure [4].

Normativa italiana ed europea

L'acqua è una risorsa essenziale per la vita umana, la natura e l'economia, ma è una risorsa finita, per questo motivo l'Unione Europea ha voluto avviare un percorso per la corretta gestione e la salvaguardia

* monica.potalivo@isprambiente.it

del buono stato di qualità delle acque presenti sul territorio europeo con l'emanazione della Direttiva 2000/60/CE, nota anche come Direttiva Quadro Acque.

La DQA ha introdotto un approccio innovativo nella legislazione europea in materia di acque, tanto dal punto di vista ambientale, quanto amministrativo-gestionale. Essa persegue gli obiettivi di prevenire il deterioramento qualitativo e quantitativo, migliorare lo stato delle acque e assicurare un utilizzo sostenibile, basato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili.

Per le acque superficiali, gli Stati membri devono garantire il raggiungimento del migliore stato chimico ed ecologico possibile, tenuto conto degli impatti che non avrebbero potuto ragionevolmente essere evitati data la natura dell'attività umana o dell'inquinamento.

Pertanto tutta la normativa italiana sulle acque recepisce le indicazioni della DQA e delle sue Direttive figlie nel D.Lgs 152/06 e s.m.i. I decreti attuativi del D.Lgs 152/06 e s.m.i. sono: il DM n.131/2008, DM n.56/2009 e il DM n.260/2010. In particolare, il D.M n.131/2008 reca i criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni); nel D.M. n.56/2009 vengono invece riportati i "Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento"; infine il D.M. n.260/2010 introduce i criteri aggiornati per il monitoraggio e la classificazione dei corpi idrici superficiali e sotterranei.

Per la definizione dello stato chimico si fa riferimento all'art. 16, paragrafo 2 della DQA, dove è stato stilato un elenco di sostanze, dette prioritarie, di cui è stato definito uno Standard di Qualità Ambientale (SQA) che non deve essere superato per avere uno stato chimico buono dei corpi idrici. I risultati del monitoraggio chimico dei corpi idrici concorrono alla classificazione dello stato chimico della risorsa idrica e quindi alla valutazione del grado di scostamento dagli obiettivi di qualità imposti dalla normativa europea.

Inoltre, la Direttiva 39/2013/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 agosto 2013 prevede anche, all'art.8, l'istituzione del monitoraggio di sostanze inserite nella lista di controllo (*Watch List*) che potenzialmente possono successivamente essere inserite nell'elenco delle sostanze prioritarie tramite esercizi di determinazione dei loro SQA per la classificazione dello stato chimico dei corpi idrici. Dal 2013 ad oggi sono state emanate tre Decisioni della Commissione Europea di modifica delle liste di controllo e di seguito riportate.

- Decisione di esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione del 20 marzo 2015 che istituisce un elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione nel settore della politica delle acque in attuazione della direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio adotta Il primo elenco di controllo
- Decisione di esecuzione (UE) 2018/840 della Commissione del 5 giugno 2018 che istituisce

un elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione nel settore della politica delle acque in attuazione della direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e che abroga la decisione di esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione

- Decisione di esecuzione (UE) 2020/1161 della Commissione del 4 agosto 2020 che istituisce un elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione nel settore della politica delle acque in attuazione della direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio

Alle suddette Direttive si aggiunge la Direttiva 90/2009/CE - specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque, recepita in Italia dal D.Lgs.219/2010. Tale Direttiva definisce le regole da seguire per assicurare la qualità dei dati di monitoraggio e la comparabilità degli stessi tra gli Stati Membri della Comunità Europea.

L'importanza dei materiali di riferimento e dei confronti interlaboratorio per l'assicurazione di qualità dei dati.

In ogni campo di misura, i Materiali di Riferimento (RM) e i Materiali di Riferimento Certificati (CRM) sono fondamentali per assicurare la riferibilità e la comparabilità dei dati. Essi sono materiali (solidi, liquidi, gassosi) in matrice, o meno, sufficientemente omogenei e stabili nel tempo, rispetto a proprietà specificate, che si è stabilito essere idonei per l'utilizzo previsto in una misurazione. I CRM in particolare sono accompagnati da una dichiarazione in merito alla riferibilità nonché dall'incertezza associata ai valori assegnati alle proprietà di interesse. I materiali di riferimento sono destinati in generale alla convalida dei metodi analitici, all'organizzazione di confronti interlaboratorio per valutare le prestazioni analitiche di uno o più laboratori, nonché nelle procedure di controllo interno selezionate dai laboratori (ad esempio costruzione di carte di controllo). Per tenere sotto controllo l'intero processo di misura è raccomandato l'impiego di RM/CRM, con matrice il più possibile simile a quella dei campioni reali.

Anche nell'ambito della classificazione dello stato chimico dei corpi idrici, la disponibilità di materiali di riferimento è quindi fondamentale per la comparabilità dei dati a livello nazionale ed europeo dei monitoraggi richiesti dalla DQA sui diversi corpi idrici. La loro produzione richiede, tra l'altro, la dimostrazione dell'omogeneità e della stabilità nel tempo attraverso l'esecuzione di studi sperimentali specifici, in accordo a piani statistici idonei. In tale contesto, valgono le indicazioni contenute nella ISO Guide 35 [5].

Dal 2013 l'Area Metrologia di ISPRA ha prodotto un numero significativo di RM liquidi (Tabella 1 e 2) in metanolo o acqua di miscele contenenti sostanze prioritarie riportate nelle Direttive 2008/105/CE e 39/2013/UE e sostanze emergenti inserite nelle liste di controllo dalle Decisioni soprariportate destinati all'organizzazione di confronti interlaboratorio per i laboratori del SNPA e per due studi interlaboratorio organizzati dal *Joint Research Centre* di Ispra (Va).

Tabella 1. Materiali di riferimento prodotti da ISPRA a) nel 2013 e b) nel 2018. Nell'ultima riga delle due tabelle sono riportate le indicazioni sui solventi utilizzati per la produzione e la conservazione dei RM.

ISPRA RM040 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM041 µg/L (1000 · SQA)	ISPRA RM042 µg/L (1000 · SQA)	ISPRA RM043 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM044 µg/L (1000 · SQA)		
Atrazina	Atrazina	Atrazina				
BaP	BaP	BaP				
Clorfenvinfos	Clorfenvinfos	Clorfenvinfos				
Clorpirifos	Clorpirifos	Clorpirifos				
DEHP	DEHP	DEHP				
Diclofenac	Diclofenac	Diclofenac				
Diuron	Diuron	Diuron				
17 beta-estradiolo	17 beta-estradiolo	17 beta-estradiolo				
Fluorantene	Fluorantene	Fluorantene				
Isoproturon	Isoproturon	Isoproturon				
4-Nonilfenolo	4-Nonilfenolo	4-Nonilfenolo				
Simazina	Simazina	Simazina				
		Sostanze Emergenti				
		Carbamazepina				
		Sulfametossazolo				
		Triclosan				
		DEET				
		Bisphenolo A				
			Metalli	Metalli		
			Ni	Ni		
			Cd	Cd		
a)	Metanolo	Metanolo	Metanolo	Acqua, 2% HNO3	Acqua, 2% HNO3	
ISPRA RM076 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM077 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM078 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM081 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM082 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM083 µg/L (10000 · SQA)	ISPRA RM084 µg/L (1000 · SQA)
Atrazina	Atrazina		Atrazina	Atrazina	Estrone (E1)	Estrone (E1)
BaP	BaP		BAP	BAP	α-Estradiolo (EE2)	α-Estradiolo (EE2)
Clorfenvinfos	Clorfenvinfos		Clorfenvinfos	Clorfenvinfos	β-Estradiolo (E2)	β-Estradiolo (E2)
Clorpirifos	Clorpirifos		Clorpirifos	Clorpirifos		
DEHP	DEHP		DEHP	DEHP		
Diclofenac	Diclofenac		Diuron	Diuron		
Diuron	Diuron		Fluorantene	Fluorantene		
17 beta-estradiolo	17 beta-estradiolo		Isoproturon	Isoproturon		
Fluorantene	Fluorantene		4-Nonilfenolo	4-Nonilfenolo		
Isoproturon	Isoproturon		Simazina	Simazina		
4-Nonilfenolo	4-Nonilfenolo			Carbamazepina		
Simazina	Simazina			Sulfametossazolo		
	Sost. Emergenti			Triclosan		
	Carbamazepine			Bisphenolo A		
	Sulfametossazolo			DEET		
	Triclosan					
	DEET					
	Bisphenolo A					
		Metalli				
		Ni				
		Cd				
b)	Metanolo	Metanolo	Acqua, 2% HNO3	Metanolo	Metanolo	Metanolo

Omogeneità e stabilità

Sui materiali prodotti sono state condotte da parte di ISPRA prove per la valutazione di omogeneità e della stabilità.

Lo studio di omogeneità ha previsto la selezione di dieci (10) unità di materiale di prova su ognuna delle quali sono state eseguite tre (3) misure indipendenti.

Le prove di stabilità nel breve-medio termine sono state effettuate per un periodo di circa due mesi alla temperatura di 20°C e -18°C in condizioni "isocrone". La prova "isocrona", in cui tutte le unità sono misurate in condizioni di ripetibilità ristretta, copre il trasporto e la conservazione del materiale in laboratorio prima delle misure.

Valori assegnati

I valori assegnati dei diversi RM sono stati definiti gravimetricamente mentre per i materiali ISPRA RM047, ISPRA RM048, ISPRA RM049 e ISPRA RM076 il valore di riferimento è stato ottenuto quale valore di consenso dei risultati delle misure effettuate con metodi chimici dai laboratori SNPA partecipanti al confronto interlaboratorio. L'incertezza associata a tale valore è calcolata con l'Equazione 1, in accordo a ISO 13528:2015 (Par. 7.7.3) [6].

(Equazione 1)

$$u_{rif} = \frac{1.25 \cdot \sigma_r}{\sqrt{m}}$$

- σ_r = scarto tipo robusto dei risultati dei laboratori
 - m = numero di laboratori

L'incertezza tipo u_{rif} è moltiplicata per un fattore di copertura $k=2$ (intervallo di fiducia del 95%) per essere espressa in forma estesa.

A titolo esemplificativo si riportano, in Tabella 2, i valori assegnati delle proprietà di interesse e le relative incertezze associate, espresse in forma estesa, dei

Tabella 3. Circuiti di interconfronto organizzati da ISPRA .

Anno	Confronto interlaboratorio	Materiali di riferimento utilizzati
2014	ISPRA IC 027 - Misura della concentrazione in massa di composti organici (sostanze prioritarie) nelle acque	ISPRA RM047 ISPRA RM048 ISPRA RM049
2019	ISPRA IC 040 - Misura delle concentrazioni in massa di sostanze prioritarie nelle acque	ISPRA RM076

materiali di riferimento ISPRA RM047, ISPRA RM048, ISPRA RM049 e ISPRA RM076 dopo la ricostituzione in acqua eseguita dai singoli laboratori partecipanti ai confronti interlaboratorio.

I suddetti RM sono stati utilizzati nei seguenti interconfronti organizzati da ISPRA (Tabella 3).

Sono disponibili i rapporti tecnici di tutti i confronti sopra citati ⁽¹⁾ [7,8,9].

Il monitoraggio "Effect based"

La determinazione delle sostanze emergenti, quali farmaci, pesticidi e altri composti chimici utilizzati dall'industria richiedono livelli di quantificazione molto bassi e ciò comporta una complessa attività di sviluppo e validazione dei metodi analitici e un'elevata qualificazione del personale coinvolto, aggiornamento e motivazione. Questa esigenza di mettere a punto e validare metodi chimici sempre più complessi e sfidanti ha portato ad un cambio di paradigma nell'affrontare tale problematica: i) cercare metodi più semplici e speditivi; ii) utilizzare metodi di screening per definire la presenza di sostanze inquinanti; iii) rilevare la contemporanea presenza di sostanze inquinanti considerando i possibili effetti sinergici.

Tabella 2. Valori assegnati di riferimento.

	ISPRARM047 µg L ⁻¹	ISPRARM048 µg L ⁻¹	ISPRARM049 µg L ⁻¹	ISPRARM076 µg L ⁻¹
Atrazina	1,5 ± 0,2	1785 ± 58	774 ± 66	2,95 ± 0,26
Benzo[a]pirene	0,011 ± 0,002	15,0 ± 2,7	6,5 ± 1,0	0,0010 ± 0,0002
Clorfenvinphos				0,45 ± 0,08
Clorpirifos	0,078 ± 0,014	90 ± 5	38,9 ± 3,0	0,16 ± 0,03
DEHP	2,8 ± 0,5	3911 ± 325	1695 ± 245	5,4 ± 1,0
Diclofenac				0,50 ± 0,08
Diuron				1,03 ± 0,08
17β-estradiolo				0,0021 ± 0,0003
Fluorantene	0,019 ± 0,003	22,5 ± 0,8	9,8 ± 0,6	0,022 ± 0,003
Isoproturon				1,46 ± 0,10
4-Nonilfenolo				1,46 ± 0,35
Simazina	1,4 ± 0,3	1514 ± 74	656 ± 56	4,49 ± 0,31

⁽¹⁾ E' possibile richiedere i Rapporti tecnici dei confronti interlaboratorio organizzati da ISPRA all'indirizzo e-mail: metrologia.ambientale@isprambiente.it

I saggi biologici, sono chiamati correntemente “metodi basati su effetti” (“*effect based methods*” EBM) e includono “*biomarkers*” e saggi ecotossicologici, e possono mettere in evidenza effetti biologici combinati causati da miscele complesse di sostanze antropogeniche. Diversamente i metodi chimici evidenziano solo la presenza del singolo composto valutandone la concentrazione rispetto ad un valore soglia (SQA) determinato per ognuno di questi.

E' quindi importante un'integrazione tra l'analisi chimica e l'analisi con saggi biologici: partendo dall'evidenza di effetti ecologici/ecotossicologici si giunge all'identificazione dell'inquinante che causa questi effetti correlando la qualità ecologica e quella chimica nei corpi idrici.

Impieghi degli EBM in Europa e in Italia

I saggi biologici sono già previsti nelle normative di alcuni Paesi europei.

La Repubblica Ceca impiega gli EBM per individuare rischi annessi all'ambiente acquatico, la Danimarca li utilizza nel monitoraggio delle acque; la Germania, l'Olanda e la Norvegia li impiegano nella caratterizzazione dei sedimenti nei dragaggi e nei relativi monitoraggi.

Nel Regno Unito è in fase di sviluppo un approccio per la caratterizzazione dei sedimenti che prevede l'impiego sia di metodi chimici che di EBM. In Italia gli EBM sono utilizzati nella valutazione dello stato di qualità delle acque marino-costiere e di transizione quando si registrano dei superamenti degli Standard di Qualità Ambientale nei sedimenti. Sono anche impiegati a supporto della DQA nei programmi di monitoraggio richiesti: i) per consentire l'immissione in mare dei sedimenti dragati e ii) per il controllo degli scarichi urbani ed industriali.

Si stanno sperimentando utilizzi nella caratterizzazione e classificazione dei rifiuti per la definizione della caratteristica di pericolo HP14 – ecotossico [10,11].

Il progetto per l'utilizzo degli EBM per l'analisi di miscele nelle acque superficiali

Utilizzando i Materiali di riferimento prodotti dal laboratorio dell'Area di Metrologia di ISPRA, il JRC ha avviato uno studio approfondito sulla possibilità di utilizzare un insieme di metodi biologici, sia di routine che innovativi, nel monitoraggio della qualità delle acque per investigare gli effetti provocati dalle miscele di sostanze inquinanti sull'ambiente. Il progetto dal titolo “*Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment: the 2012 Europe-wide exercise*” ha messo a confronto la sensibilità di diversi saggi biologici, con differenti “end point” e a diversi livelli trofici (riportati nella tabella 4), rispetto alle sostanze contenute nei RM al fine di valutare se tali miscele possono essere analizzate con i saggi biologici (EBMs) e ottenere un'accurata valutazione del rischio collegato agli inquinanti nell'ambiente acquatico [1,2]. Gli EBM utilizzati nel progetto includevano metodi già validati in norme tecniche ISO, ASTM, EN e metodi non validati [12-17]. I RM venivano ricostituiti in acqua dai singoli laboratori partecipanti allo studio con livelli di concentrazione delle

diverse sostanze vicini agli standard di qualità ambientale o 10 volte superiori. E' da considerare che i limiti definiti nella DQA sono stati scelti in base al criterio di garantire sia la salute umana che l'ambiente. Le sostanze contenute nei RM sono pesticidi, composti farmaceutici e prodotti derivanti da lavorazioni dell'industria chimica.

E' importante conoscere il meccanismo d'azione delle sostanze presenti nei corpi idrici e le loro potenziali interazioni; infatti dipende dal loro meccanismo di azione se queste sostanze esercitano un effetto additivo, sinergico o antagonista sugli organismi rispetto alla somma degli effetti misurati quando sono presenti singolarmente nelle acque. Gli effetti combinati delle miscele di sostanze inquinanti non possono essere evidenziati quando i composti della miscela vengono analizzati singolarmente e la classificazione dello stato del corpo idrico viene definito dal supera-

Tabella 4. EBM utilizzati nel progetto “*Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment: the 2012 Europe-wide exercise*” .

Saggi biologici (EBM)
AR-induzione della luciferase nelle cellule MDA-kb2
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematode): inibizione della crescita, accumulo lipidico, attività e pompaggio faringeo
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematode): stimolazione della risposta proteica a diversi fattori di stress
CALUX (AR-CALUX, ER-CALUX e PPAR-CALUX)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : inibizione della crescita e della fotosintesi
<i>Daphnia magna</i> EN ISO 6341: saggio acuto di immobilizzazione
<i>Daphnia magna</i> CSN ISO 10706: saggio di riproduzione
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish): FET (EN ISO 15088)
<i>Dictyostelium discoideum</i> : mortalità, riproduzione e stabilità della parete lisosomiale
EASZY (saggio) su embrioni transgenici di zebrafish
ER-binding/attivazione in cellule MELN
<i>Escherichia Coli</i> : stimolazione dei bio markers
<i>Gasterosteus Aculeatus</i> : mortalità cellulare e parametri di immunotossicità su cellule spleniche
Linee cellulari HeLa, LMH, ZFL: espressione genica e valutazione dei biomarkers (qRT-PCR)
MTT (Saggio), linee cellulari: RTG-2, RPTEC/TERT1, HepG2, MCF7, HUVEC/TERT. Citotossicità in vitro
Microcosmi in acqua marina: produzione batterica e concentrazione dei pigmenti.
Neutral Red (NR): Saggio di citotossicità
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (ISO 8692): velocità di crescita
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : effetti sulla fotosintesi
<i>Thalassiosira pseudonana</i> : inibizione della crescita
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Saggio acuto di tossicità, inibizione della crescita e genotossicità
<i>Salmo salar</i> : valutazione di citotossicità su epatociti delle forme giovanili del salmone atlantico (xCELLigence systems)
<i>Salmo salar</i> : ELISA (valutazione di Vtg e Zrp); qRT-PCR (valutazione di Vtg, ERa, Zrp)
<i>Vibrio fischeri</i> : Microtox EN ISO 11348-3: inibizione della bioluminescenza
wTERα binding assay
<i>Xenopus laevis</i> : FETAX (ASTM E 1439), teratogenicità e malformazioni negli embrioni
YES: attività ER-binding

mento o meno degli SQA delle singole sostanze prioritarie. Il progetto ha voluto mettere in evidenza l'utilità di inserire alcuni EBM nella revisione della DQA come metodi per evidenziare la presenza di miscele negli ambienti acquatici valutandone, attraverso gli effetti provocati, la presenza e il rischio per l'ambiente [18].

I risultati del progetto hanno evidenziato una generale comparabilità tra saggi con lo stesso "end point" e classi di sostanze. I RM, alle concentrazioni sopradescritte, provocano effetti nocivi in alcuni saggi. Tra questi ritroviamo cambiamenti nella composizione batterio-algale in microcosmo marino, l'effetto di immobilizzazione in *Daphnia magna*, tossicità nell'embrione di pesce e effetti sullo sviluppo dell'embrione di rana. Inoltre l'aumento di espressione del gene reporter associato a stress ossidativo è stata osservata sia in *Caenorhabditis elegans* che in *Escherichia coli*.

Saggi basati sul legame al recettore estrogenico hanno registrato la presenza di composti con attività estrogenica anche al livello di SQA di alcune sostanze evidenziando la capacità dei saggi biologici ad essere usati come screening per semplificare e migliorare la gestione del monitoraggio delle acque.

Si riportano, come esempio, in figura 1 i risultati sull'effetto di immobilizzazione della *Daphnia magna* eseguiti da 3 laboratori europei con 2 RM a due concentrazioni diverse.

Un secondo esercizio a livello europeo è stato quindi avviato per valutare l'applicazione di una batteria di saggi che potesse identificare la qualità di un campione ambientale confrontandolo ad un materiale di riferimento. In particolare determinare effetti estrogenici a concentrazioni molto basse di ormoni o di interferenti endocrini. Gli estrogeni sono presenti in moltissimi corsi d'acqua a causa dell'ampia diffusione di questi farmaci sia per l'utilizzo umano che nell'allevamento animale, ma causano effetti avversi in molte specie acquatiche.

Nel 2018 sono stati quindi utilizzati i RM della tabella 1b) per definire criteri standard quali valori soglia per poterli inserire nella normativa europea.

L'uso dei RM per la determinazione dei valori soglia per la presenza di ormoni nelle acque è stato testato da alcuni laboratori europei utilizzando i saggi riportati nella tabella 5. I risultati saranno resi noti nell'anno in corso.

Tabella 5. Saggi biologici utilizzati nel secondo confronto interlaboratorio su RM contenenti miscele di sostanze prioritarie ed emergenti (2018).

Saggi biologici in vitro basati su linee cellulari umane e di lievito per la valutazione dell'attività estrogenica	Lyticase Yeast estrogenic screen (LYES), saggio di screening per l'attività estrogenica assistito da digestione enzimatica con liticasi (cellule di lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	ER-CALUX ^o (Chemical Activated Luciferase gene eXpression), linee cellulari umane geneticamente modificate U2OS.
	linee cellulari ER α -HeLa-9903 (attività estrogenica)
	linee cellulari ER α -HeLa-9903 (attività anti-estrogenica)
	ER-binding/activation in linee cellulari MELN, saggio di attivazione/legame del recettore estrogenico
	Linee cellulari ER α GeneBLAzer
Legame con il recettore	Planar Yeast estrogenic screen (pYES), saggio di screening su strato sottile planare per l'attività estrogenica (cellule di lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	Ligand Binding Estrogen Receptor Assay (LiBERA), saggio basato sul legame con il recettore estrogenico
Analisi di espressione genica con qRT-PCR	Linee cellulari di carcinoma epatocellulare <i>Poeciliopsis lucida</i> derivate da PLHC-1 esposte a biomarkers, <i>erα</i> e <i>vtg</i>
	Pesce Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) Esposizione con biomarker <i>vtg</i> nelle prime fasi di vita dei pesci

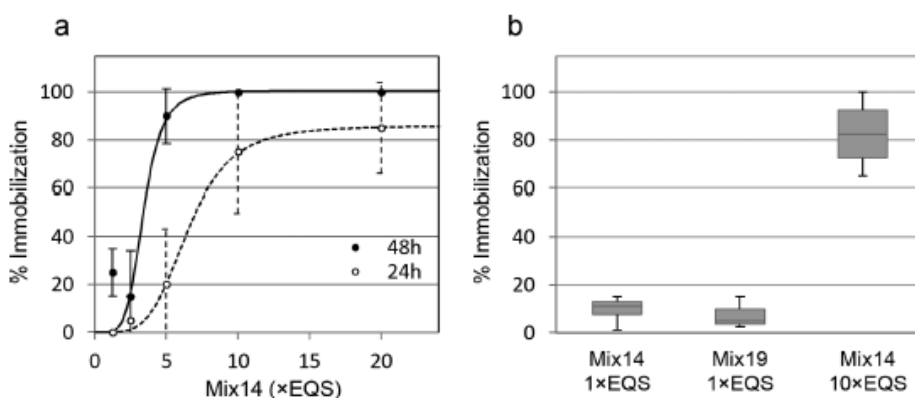


Figura 1. Immobilizzazione acuta in *D. magna* (a) Curva dose-risposta della RM a concentrazione SQA (simbolo vuoto) esposizione per 24h e (simbolo pieno) esposizione a 48h. Le linee rappresentano la regressione non-lineare dei dati per il calcolo dell'EC50. Le barre rappresentano lo scarto tipo per n=4. (b) Analisi dei risultati di 3 differenti laboratori per i diversi RM: ISPRA RM 041 + 044 + 1L di H2O o tampone (ricostituiti alla concentrazione dell'SQA con il nome di MIX 14); ISPRA RM 040 + 043 + 1L di H2O o tampone (ricostituiti alla concentrazione di 10 volte SQA) e ISPRA RM 042 + 044 + 1L di H2O o tampone (ricostituiti alla concentrazione dell'SQA con il nome di MIX 19).

Tabella 6. Saggi biologici che verranno ottimizzati e validati per rispondere alle richieste di utilizzo nella valutazione dello stato della qualità delle acque nel progetto 18NRM01 EDC-WFD .

Saggi biologici
CALUX secondo la ISO 19040:3 (2018) "Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay"
Ligand Binding Estrogen receptor (LIBER) Assay
A-YES secondo la ISO 19040:2 (2018) "Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, <i>Arxula adeninivorans</i>)"
Saggio in vitro del recettore estrogenico (ERA) mediante linee cellulari modificate MELN

Il progetto per l'analisi di miscele di ormoni nelle acque superficiali tramite l'uso di metodo chimici ed EBM

Il Progetto "Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive (18NRM01 EDC-WFD)" ha lo scopo di sviluppare metodi analitici tracciabili per determinare gli interferenti endocrini focalizzandosi sui tre estrogeni già inseriti nel primo elenco di controllo e cioè: 17-beta-estradiolo (17βE2), 17-alfa-etinilestradiolo (EE2), ed estrone (E1). A questi sono stati aggiunti altri due ormoni 17-alfa-estradiolo (17αE2) ed estriolo (E3). Il progetto è quindi finalizzato a dimostrare la riferibilità, la comparabilità a livello europeo e la compatibilità dei metodi chimici basati sulla spettrometria di massa e di quattro metodi biologici basati sugli effetti (EBM), rispondendo così alle richieste delle Direttive 2013/39/EC, 2009/90/EC e alla Decisione (EU) 2018/840 [19, 20, 21].

Gli EBM scelti (Tab. 6) dovranno essere investigati approfonditamente per migliorarne il loro uso razionale a supporto della valutazione dello stato della qualità delle acque [22, 23].

Più precisamente gli obiettivi del progetto sono:

1. ottimizzare e validare metodi chimici basati sulla spettrometria di massa su campioni della colonna d'acqua al livello degli Standard di Qualità Ambientale per miscele degli ormoni sopracitati e con un limite di quantificazione (LOQ) che non superi il 30% dello SQA e con un'incertezza ≤ 50% al SQA;
2. valutare le interazioni e la ripartizione degli ormoni tra l'acqua e il particolato in sospensione;

3. sviluppare il metodo per la produzione di RM con campioni reali o molto vicini ad una matrice reale;
4. migliorare la comparabilità tra le risposte degli EBM e i metodi chimici a spettrometria di massa;
5. organizzare un confronto interlaboratorio per dimostrare le caratteristiche prestazionali dei metodi sviluppati usando i RM prodotti con gli ormoni;
6. collaborare con CEN TC 230 e ISO TC 147 per contribuire alla standardizzazione di questi metodi.

Il progetto seguirà quindi le fasi riportate in figura 2 e che consistono: nella validazione dei metodi chimici basati sulla spettroscopia di massa e degli EBM; nella produzione di materiali di riferimento certificati al fine di verificare le caratteristiche prestazionali dei metodi anche attraverso un circuito di interconfronto organizzato alla fine del progetto tra i INM europei e laboratori esperti [25, 26].

Il progetto permetterà quindi di validare metodi rapidi di analisi sfruttando i saggi biologici basati sugli effetti, le cui risposte potranno essere confrontate con i metodi chimici basati sulla spettrometria di massa. Gli EBM infatti, consentono di ottenere una risposta complessiva della possibile attività estrogenica presente in un campione di acqua non potendo discriminare però il contributo dei possibili composti presenti ed è quindi necessario trovare dei valori soglia che siano confrontabili con gli SQA dei metodi chimici.

Riferimenti bibliografici

- 1) Raquel N. Carvalho, Magdalena Niegowska, Livia Gomez Cortes, Teresa Lettieri, Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment. A European wide exercise,. EUR 29505 EN, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019, ISBN 978-92-79-98270-5, doi:10.2760/565375, JRC114143
- 2) Carvalho RN, Arukwe A, Ait-Aissa S, Bado-Nilles A, Balzamo S, Baun A, Belkin S, Blaha L, Brion F, Conti D, Creusot N, et al. (2014) Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: how safe are they? Toxicol Sci. 141 (1):218-233.
- 3) TECHNICAL REPORT ON AQUATIC EFFECT-BASED MONITORING TOOLS- Technical Report - 2014 - 077

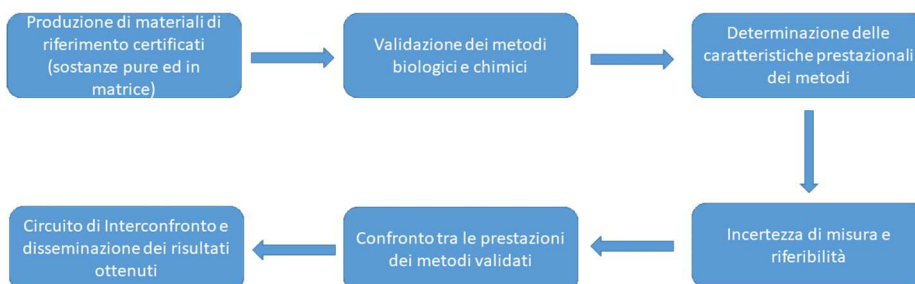


Figura 2. Diagramma di flusso delle attività del progetto 18NRM01 EDC-WFD .

- 4) <http://projects.lne.eu/jrp-edc-wfd/>
- 5) ISO Guide 35:2017 "Reference Material-General and statistical principles for certification"
- 6) ISO 13528:2015 (E) "Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparisons"
- 7) ISPRA Area Metrologia, febbraio 2014 "Rapporto Conclusivo, Interconfronto ISPRA-IC027: Misura della concentrazione in massa di composti organici (sostanze prioritarie) nelle acque"
- 8) ISPRA Area Metrologia, marzo 2016 "Rapporto Conclusivo, Prova Valutativa Interlaboratorio ISPRA-IC032: Misura della concentrazione in massa di composti organici (sostanze prioritarie) nelle acque"
- 9) ISPRA Area Metrologia, novembre 2019 "Rapporto conclusivo, Interconfronto ISPRA - IC040: Misura delle concentrazioni in massa di sostanze prioritarie nelle acque"
- 10) A. Dick Vethaak, Joost Lahr, S. Marca Schrap, Ange ´lique C. Belfroid, Gerard B.J. Rijs, Anton Geritsen, Jacob de Boer, Astrid S. Bulder, Guy C.M. Grinwis, Raoul V. Kuiper, Juliette Legler, Tinka A.J. Murk, Willie Peijnenburg, Henk J.M. Verhaar, Pim de Voogt, "An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands" - Chemosphere 59 (2005) 511–524
- 11) P. Valitalo, Noora Perkola, Thomas-Benjamin Seiler, Markus Sillanpa, Jochen Kuckelkorn, Anna Mikola, Henner Hollert, Eija Schultz, "Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents"- Water Research 88 (2016) 740 – 749
- 12) UNI EN ISO 6341: Qualita' dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilita' di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicita' acuta
- 13) ISO 10706: Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- 14) UNI EN ISO 15088 Qualita' dell'acqua - Determinazione della tossicita' acuta delle acque reflue per le uova di pesce zebra (*Danio rerio*)
- 15) UNI EN ISO 8692 Qualita' dell'acqua - Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi
- 16) EN ISO 11348-3 Qualita' dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati
- 17) ASTM E 1439 Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)
- 18) Dorota Napierska, Isabella Sanseverino, Robert Loos, Livia Gómez Cortés, Magdalena Niegowska and Teresa Lettieri, Modes of action of the current Priority Substances list under the Water Framework Directive and other substances of interest, EUR 29008 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-77301-3, doi:10.2760/226911, JRC110117
- 19) Masaru Ihara, Mariko O. Ihara, Vimal Kumar, Masanori Narumiya, Seiya Hanamoto, Norihide Nakada, Naoyuki Yamashita, Shinichi Miyagawa, Taisen Iguchi and Hiroaki Tanaka, Co-occurrence of Estrogenic and Antiestrogenic Activities in Wastewater: Quantitative Evaluation of Balance by in Vitro ER α Reporter Gene Assay and Chemical Analysis- Environ. Sci. Technol. 2014, 48, 6366–6373
- 20) Miha Avberšek, Bojana Žegura, Metka Filipič, Ester Heath, "Integration of GC-MSD and ER-Calux® assay into a single protocol for determining steroid estrogens in environmental samples" - Science of the Total Environment 409 (2011) 5069–5075
- 21) Escher BI, Aït-Aïssa S, Behnisch PA, Brack W, Brion F, Brouwer A, et al. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. Science of The Total Environment 2018a; 628-629: 748-765.
- 22) ISO-19040-1. Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*).
- 23) ISO-19040-3. Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay
- 24) ISO 19040-2:2018 Water quality -Determination of the estrogenic potential of water and waste water Yeast estrogen screen (A-YES, *Arxula adenivorans*)
- 25) Brack W, Aissa SA, Backhaus T, Dulio V, Escher BI, Faust M, et al. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environmental Sciences Europe 2019; 31: 10
- 26) Könemann S, Kase R, Simon E, Swart K, Buchinger S, Schlüsener M, et al. Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2018; 102: 225-235

Utilizzo di metodi *in silico* e *read-across* per la valutazione di miscele

a cura di

Emilio Benfenati (*), Istituto di ricerche di Ricerche Farmacologiche Mario Negri – IRCCS, Via Mario Negri 2, Milano

RIASSUNTO

La valutazione delle miscele di sostanze richiede uno sforzo enorme, per la complessità della materia. A supporto di questo compito, i cosiddetti *non-testing methods*, ovvero i metodi *in silico* e quelli *read-across*, possono agevolare notevolmente la valutazione. Già attualmente esistono dei metodi che consentono di fornire dati mancanti su alcuni componenti delle miscele. Questi dati possono essere sia sulla parte degli effetti che sull'esposizione. Inoltre, vi sono dei modelli che stimano il meccanismo d'azione. Pochi modelli sono in grado attualmente di valutare effetti agonistici e antagonistici. Questi approcci avranno un ruolo sempre maggiore nella valutazione delle miscele.

SUMMARY

The evaluation of mixtures of substances requires an enormous effort, due to the complexity of the subject. To support this task, the so-called *non-testing methods*, i.e. *in silico* and *read-across* methods, can greatly facilitate the evaluation. There are already methods that allow to provide missing data on some components of the mixtures. These data can be related either on the effects or on exposure. In addition, there are models that estimate the mechanism of action. Few models are currently able to evaluate competitive and antagonistic effects. These approaches will play an increasing role in the evaluation of mixtures.

1. INTRODUZIONE

La valutazione delle proprietà delle sostanze richiede molto spesso una grande mole di risorse, con tempi che di solito sono lunghi, con aggravio dei costi. Da ormai qualche decennio la comunità scientifica e anche le autorità utilizzano i cosiddetti metodi *in silico*, e più in generale quelli che si possono accomunare come metodi non di laboratorio, i *non-testing methods* (NTM), nella denominazione inglese. I NTM includono i metodi *read-across* e quelli *in silico*.

Il termine *in silico* fa riferimento al fatto che si usa il computer per ottenere il valore della proprietà di interesse, e quindi si utilizza una terminologia mutuata per analogia a quella impiegata per le altre metodiche che invece utilizzano metodi di laboratorio, quali i metodi *in vivo* e *in vitro*, e in alcuni casi si parla anche di metodi in chimico (per valutare sperimentalmente la reattività di certe sostanze).

Il termine *in silico* è in realtà piuttosto vago, perché il computer è utilizzato ormai in ogni ambito scientifico, e il New York Times già all'inizio del millennio titolava che tutta la scienza è *in silico*. In ambito di valutazione delle sostanze, metodiche *in silico* sono ad esempio utilizzate per processare le grandi quantità di dati ottenibili dai metodi di omica. Nel nostro caso ci occuperemo dei metodi che riguardano la valutazione degli effetti tossici utilizzando le informazioni relative alla sostanza chimica che causa l'effetto. Si parla anche di metodi *quantitative structure-activity relationships* (QSAR) o anche solo *structure-activity relationships* (SAR), dove appunto si mette l'accento sulla relazione che si sta esplorando e valutando fra la

struttura chimica, da un lato, e l'attività, dall'altro. Fra questi due aspetti vi è appunto una relazione (questa è l'ipotesi) che prende la forma di un algoritmo o di una regola. Se la relazione è quantitativa si parla di QSAR, se invece la relazione è categoriale (tossico/non tossico) si parla di SAR.

Per descrivere la sostanza chimica si utilizzano dei descrittori molecolari, tipicamente, e se ne possono calcolare migliaia. Questi descrittori partono dalla struttura bidimensionale o tridimensionale, e includono informazioni a volte semplici e di comprensione comune (il peso molecolare, il numero di atomi di cloro, il volume della molecola), a volte invece si tratta del risultato di equazioni complesse che integrano ad esempio informazioni sulla topologia della molecola, la distribuzione delle cariche etc. in un unico valore.

Mentre inizialmente i modelli QSAR erano piuttosto semplici, con pochi descrittori, ed equazioni multivariate, negli ultimi anni si sono proposti algoritmi sempre più sofisticati, di intelligenza artificiale, *machine learning*, ultimamente anche di *deep learning*. Questo progredire della metodologia rende stretta la definizione e l'utilizzo del termine QSAR, e per questo il termine *in silico* forse si presta ad accorparsi meglio la grande quantità di approcci. I metodi *in silico* sono sempre più numerosi. Ad esempio, per la mutagenicità secondo il test di Ames vi sono più di 60 modelli disponibili e utilizzabili perché implementati, circa metà dei quali gratuiti (mentre il numero dei metodi pubblicati è molto maggiore). Le autorità chiedono di utilizzare possibilmente più di un modello per la stessa proprietà.

* emilio.benfenati@marionegri.it

Per una discussione più approfondita sui metodi *in silico* esistono delle review (Benfenati e Lombardo, 2020; Benfenati, 2016).

I metodi *read-across* si rifanno a una pratica che è molto più comune da parte degli utenti, soprattutto per le registrazioni effettuate dalle industrie. In mancanza di dati, si guarda il valore della proprietà per una o (meglio) più sostanze simili. Questa modalità è tipicamente eseguita sulla base di valutazioni dell'esperto. I punti critici sono la definizione della similarità. Abbiamo dimostrato che anche usando software ben consolidati, vi è una ampia difformità dei risultati, mentre l'impiego di software più riproducibili, quali ToxRead, elimina questo problema (Benfenati et al., 2016). Infatti, la similarità non è una caratteristica intrinseca della sostanza, ma occorre sempre contestualizzarla allo scopo e alla metrica utilizzata. Per le procedure a mano, ci si rifà all'esperienza personale, a quello che l'esperto ha visto in passato su sostanze di una certa famiglia, e su possibili aspetti da valutare. Vi sono anche metodi computerizzati per il *read-across*, e si possono citare l'OECD QSAR Toolbox (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>), AMBIT (<http://cefic-lri.org/toolbox/ambit/>), VEGA (<https://www.vegahub.eu/>), e ToxRead (<https://www.vegahub.eu/>).

Le caratteristiche da valutare per il *read-across* sono la similarità chimica, ma anche altre proprietà, come quelle chimico-fisiche, tossicologiche e tossicocinetiche.

È chiaro che questa molteplicità di metodi, sia per quelli *in silico*, che per quelli di *read-across*, da un lato offre una ampia disponibilità di risorse, ma d'altro canto complica il lavoro e rende difficoltoso giungere a una sintesi. Infatti, l'interesse precipuo è arrivare a una valutazione quanto più accurata della proprietà d'interesse per la sostanza in esame. Per questo, sono state redatte procedure per l'integrazione dei dati eterogenei, e uno degli sforzi recenti più interessanti è quello prodotto dall'EFSA nella sua *Guidance* sul *Weight-of-evidence* (Hardy et al., 2017). Sulla base di questa *Guidance*, abbiamo valutato le diverse modalità di integrazione dei risultati provenienti da metodi *in silico* e *read-across* (Benfenati et al., 2019).

I metodi *in silico* e *read-across* per processare grandi quantità di sostanze e per molte proprietà

La valutazione delle miscele in molti casi deve affrontare il problema di valutare anche molte sostanze contemporaneamente, e per molte proprietà. Ad esempio, le sostanze presenti in un refluo urbano, nel percolato di una discarica, in un estratto vegetale, etc. tipicamente includono centinaia di sostanze o più. In realtà, dal punto di vista tossicologico e ambientale, il quesito vero è ancora più complesso, perché occorre valutare l'effetto della esposizione combinata, quindi quello che è il risultato dell'esposizione a fonti multiple, in seguito a episodi singoli, o ripetuti, o costanti, occorsi in tempi diversi. E' chiaro che questo costituisce un compito estremamente difficoltoso. Tipicamente si riduce la complessità della valutazione restringendola a un numero circoscritto di sostanze, e

tenendo conto dei dati disponibili sulle stesse. Questo approccio opportunistico introduce un alto grado di incertezza e arbitrarietà.

L'impiego di metodi *in silico* consente di processare un numero molto maggiore di sostanze e di accrescere il numero di proprietà che possono essere valutate. Infatti, i metodi *in silico* hanno il vantaggio di essere molto rapidi, di non necessitare la sostanza fisica, di funzionare in batch e di richiedere solo il computer e il software specifico. Ad esempio, all'interno del progetto CALEIDOS noi abbiamo valutato 6 milioni di sostanze, per 10 proprietà di interesse biologico e tossicologico. Queste sostanze includevano tutte quelle disponibili sul mercato. Un esempio dell'uso di metodi *in silico* relativo al processamento di decine di migliaia di sostanze presenti in estratti botanici è stato pubblicato (Raitano et al., 2019).

La copertura delle proprietà di interesse diventa pure molto più ampia grazie ai metodi *in silico*, e questo aspetto pure è molto importante, se si considera che tipicamente vi è una scarsità di dati sperimentali. Esistono molte centinaia di modelli *in silico* disponibili, nei sistemi già citati per la parte *read-across* (OECD QSAR Toolbox e VEGA), e anche in siti quali Danish QSAR Database (<http://qsar.food.dtu.dk/>), OCHEM (<https://ochem.eu/home/show.do>), EPI Suite (<https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface>), Toxtree (<https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/toxtree-tool>) e TEST (<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>). La maggior parte di questi sistemi consente di lavorare in batch (non è così per il Danish QSAR Database). Tutti i sistemi sopra citati sono gratuiti. A volte si possono scaricare sul computer, a volte funzionano via web.

Questi modelli sono in molti casi abbastanza semplici da utilizzare, anche se sistemi quali l'OECD QSAR Toolbox richiedono una formazione più approfondita.

Uno dei più semplici e al tempo stesso ricchi di modelli e di spiegazioni fornite all'utente è il sistema VEGA.

E' sufficiente la struttura della sostanza chimica, attraverso il formato SMILES, per ottenere la predizione. Il formato SMILES è quello più utilizzato per i modelli *in silico*, e rappresenta la struttura chimica con una serie di caratteri alfanumerici che utilizzano la rappresentazione degli atomi con le lettere usate per le formule brute (<https://www.daylight.com/smiles/>). La figura 1 mostra la schermata del software VEGA per l'introduzione della sostanza in esame e la scelta della proprietà da valutare. In diversi casi esistono più modelli per la stessa proprietà, ed è consigliabile selezionarli tutti. In quattro passaggi si ottengono nel giro di pochissimi secondi le predizioni: inserimento della sostanza, scelta del modello, scelta di dove scaricare il rapporto, esecuzione del modello.

VEGA è comunque collegata all'OECD QSAR Toolbox, e può essere richiamata anche dal Toolbox.

I metodi *read-across* si prestano meno bene per questo compito di riempire i dati mancanti in modo sistematico, poiché tipicamente lavorano su una sostanza alla volta. Quindi, questo metodo può servire per ap-

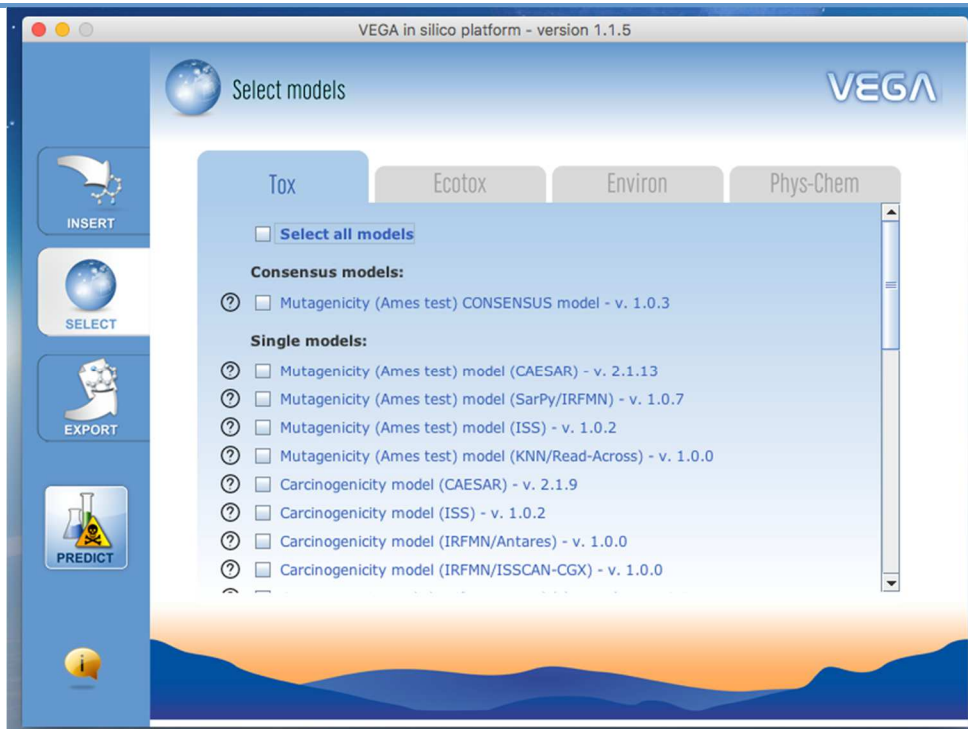


Figura 1. La schermata del sistema VEGA (www.vegahub.eu) per l'introduzione della (o delle) sostanza d'interesse e per la scelta della proprietà e del modello.

profondimenti.

Nel caso dei modelli computerizzati per il *read-across*, alcuni sono più semplici, alcuni, quali l'OECD QSAR Toolbox, sono più complessi, come si diceva.

ToxRead è uno dei più semplici, e richiede solo di inserire la struttura della molecola con il formato SMI-

LES, di indicare quante molecole simili si vogliono visualizzare, e la proprietà d'interesse.

La figura 2 mostra l'output di una valutazione *read-across* con ToxRead. Il cerchio al centro rappresenta la sostanza target. I cerchi rappresentano le molecole simili disposte intorno alla sostanze target. In questo

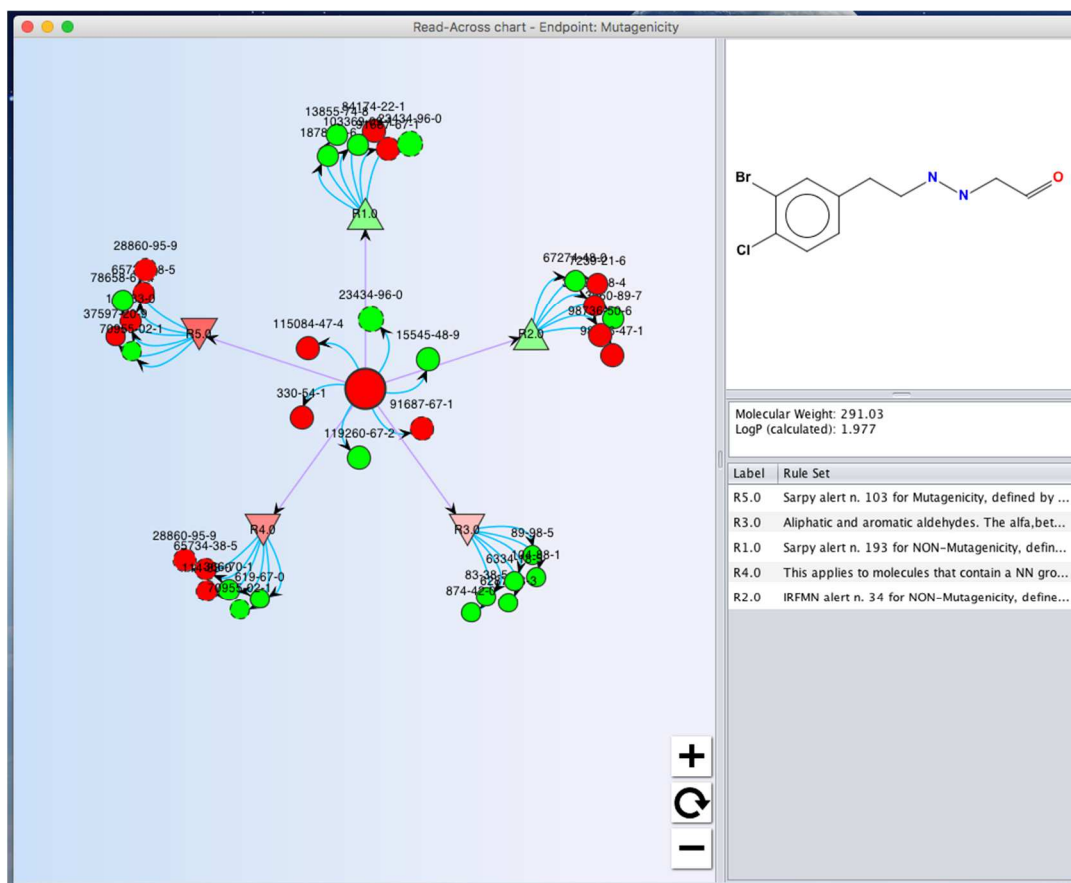


Figura 2. Esempio di output del software ToxRead per una sostanza d'interesse, valutata per la mutagenicità, secondo il test di Ames.

caso i triangoli indicano delle regole di effetto o mancanza di effetto, che servono quindi per comprendere meglio, ad esempio, il meccanismo d'azione, informazione questa molto utile per la valutazione degli effetti miscela, come vedremo in seguito. Il colore rosso o verde sta a rappresentare l'effetto tossico o no.

Va sottolineato che la natura del dato ottenuto dai NTM va sempre tenuto distinto da quelli ottenuti sperimentalmente. Infatti, il livello di attendibilità è inferiore. Ad ogni modo, la mancanza del dato comporta un grado di incertezza maggiore.

Utilizzo dei metodi *in silico* per le miscele costituite da sostanze UVCB

Un'ampia parte delle sostanze registrate per il REACH sono sostanze cosiddette UVCB, acronimo che sta a indicare: "unknown or variable composition, complex reaction products or of biological materials", ovvero sostanze a composizione sconosciuta, variabile, o risultante da prodotti di reazione e materiale di origine biologica. In questo caso, pur trattandosi di miscele spesso complesse, la composizione chimica è circoscrittibile a una serie ben definita di sostanze, e tipicamente vi sono delle catene alifatiche di lunghezza diversa, magari con grado di insaturazione variabile, e con la presenza di gruppi funzionali che possono essere in posizione diversa.

In questo caso i metodi *in silico* possono essere applicati per ripetere la valutazione per la combinazione ampia delle varie serie di sostanze chimiche che si possono originare per le permutazioni possibili dei gruppi funzionali e delle catene alifatiche diverse, ad esempio. Ecco che anche in questo caso i metodi *in silico* agevolano il compito del valutatore. Grazie al computer si possono valutare tutti i possibili rappresentanti della sostanza UVCB.

Il caso è in un certo senso una variante del metodo di processamento sistematico applicato alla composizione intera della miscela, come descritto sopra nel caso precedente, con la differenza che l'ambito strutturale è più focalizzato e che in più si possono utilizzare metodi computerizzati per generare le varie casistiche di molecole possibili.

Utilizzo dei metodi *in silico* per individuare raggruppamenti secondo modalità di azione tossicologica.

Nel caso della valutazione degli effetti delle esposizioni combinate per le quali sia nota la composizione, il metodo elettivo è quello della *concentration addition* (CA) o *dose addition* (DA). In questo caso si fa riferimento al criterio dell'additività che è applicata a sostanze che esplicano l'effetto tossico attraverso lo stesso meccanismo di azione. Il termine inglese è quello di *mode of action* (MoA). Analogamente a quanto discusso in precedenza nel caso del reperimento delle informazioni tossicologiche mancanti, per cui i modelli *in silico* ben si prestano allo scopo, anche in questo caso si verifica il problema che molto spesso l'informazione relativa al MoA è mancante. Ecco che quindi, se da un lato vi sarebbe la necessità di avere questa informazione per procedere al raggruppamento delle sostanze presenti in una miscela

o da valutare nel caso di esposizione multipla, all'atto pratico questa informazione difetta, e quindi in molti casi non si riesce a procedere opportunamente. Ancora una volta si possono impiegare dei metodi *in silico*, solo che saranno dei metodi differenti da quelli visti sopra. La proprietà da predire non è un dato di tossicità, bensì una indicazione di come la molecola esplica il proprio effetto.

Vi sono molti metodi *in silico* utilizzabili allo scopo. L'OECD QSAR Toolbox offre un'ampia lista di cosiddetti *profilers*. Tali *profilers* servono per evidenziare se una sostanza esplica il suo effetto tossico verso il fegato o il rene, ad esempio, offrendo gradi di dettaglio se l'effetto sarà dovuto a steatosi, cirrosi, colestasi o altro. Vi sono dei MoA anche per gli effetti ecotossici, che suddividono gli effetti in alcune classi, quali narcosi, reattività non specifica, reattività specifica, etc. Sono stati proposti diversi raggruppamenti per la tossicità acquatica (Kienzler et al., 2017).

Altre piattaforme che offrono modelli per raggruppare sostanze sono VEGA, Toxtree, e TEST, che sono stati citati precedentemente.

Un vantaggio dell'utilizzo dei metodi *in silico* per raggruppare le sostanze è che questa modalità ancora una volta è più sofisticata del metodo manuale e consente di sfruttare appieno le potenzialità del computer. Infatti, molto spesso vi è la tendenza di raggruppare le sostanze secondo un singolo MoA, tipico della sostanza. In realtà è verosimile ipotizzare che una sostanza operi attraverso più di un MoA. Questo complica la cosa se si procede a mano, perché ogni sostanza in esame può appartenere a più MoA. Attraverso il computer questo è molto più semplice. Alcuni programmi forniscono pure la percentuale di probabilità che una sostanza appartenga a un certo MoA, come ad esempio nel caso del MoA per la tossicità acquatica nel pesce modellata attraverso il software TEST.

Dal punto di vista regolatorio non è comune l'obbligo di valutare la esposizione combinata. Essa andrebbe valutata per i pesticidi, e in effetti l'EFSA è stata molto attiva nel pubblicare una *Guidance* su tale aspetto (More et al., 2019). Nel 2021 EFSA pubblicherà un ulteriore documento di approfondimento in cui degli scenari applicativi saranno proposti.

Proprio sui pesticidi VEGA rende disponibile un modello *in silico* per individuare una ampia serie di MoA. La tabella 1 mostra l'elenco di tali MoA.

Uso dei metodi *in silico* per raggruppare sostanze secondo cluster non predefiniti

Esistono delle situazioni in cui non si conoscono con precisione le modalità di raggruppamento, ma vi sono delle similitudini strutturali che possono essere utilizzate. Ad esempio, vi sono molte sostanze di origine vegetale che appartengono a una stessa famiglia, quali i terpeni. Se per alcuni membri di tale famiglia sono noti dei valori di proprietà tossicologica sperimentale, può essere utile valutare quanto si possono estendere le informazioni ad altri membri della stessa famiglia. Quindi il problema è diverso da quanto visto in precedenza. Si vuole utilizzare un certo numero di dati sperimentali, e ci si chiede quanto sostanze ap-

Tabella 1. Le classi chimiche e i MoA presenti nel modello MoA in VEGA.

Class	MoA
Carbamate_AChE	Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors_AChE(-)
Carbamate_MIT	Inhibition of mitosis/microtubule organization
Chloroacetamide (V1)	Inhibition of very-long-chain fatty acid synthesis (VLCFAs)
Cyclohexanedione(DIMs)	Inhibition of acetyl-CoA carboxylase (ACCCase)
Dinitroaniline	Inhibition of microtubule assembly
Dinitrophenol_1	Uncoupling (membrane disruption)
Dinitrophenol_2	Uncoupling (membrane disruption)
Hydrazine carboxylate	Mitochondrial complex III electron transport inhibitors
Imidazole_1	SBI: Class I_C14-demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)
Imidazole_2	SBI: Class I_C14-demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)
Imidazole_3	SBI: Class I_C14-demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)
Imidazole_4	SBI: Class I_C14-demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)
Morpholine/spiroketal- amines_1	SBI: Class II_Δ14-reductase and Δ8 to Δ7-isomerase in sterol biosynthesis (erg24, erg2)
Morpholine/spiroketal- amines_2	SBI: Class II_Δ14-reductase and Δ8 to Δ7-isomerase in sterol biosynthesis (erg24, erg2)
Neonicotinoid	Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) competitive modulators_nACh-R(+)
Organochlorine_1	GABA-gated chloride channel blockers_GABA-R(-)
Organochlorine_2	Sodium channel modulators_Na channel(+)
Organochlorine/cyclodiene organochlorine_1	GABA-gated chloride channel blockers_GABA-R(-)
Organochlorine/cyclodiene organochlorine_2	GABA-gated chloride channel blockers_GABA-R(-)
Organophosphate	Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors_AChE(-)
Oxadiazine	Voltage-dependent sodium channel blocker_Na channel(-)
Phenoxy-acetic acids	Synthetic auxins (action like indole acetic acid)
Pyridine carboxylic acid	Synthetic auxins (action like indole acetic acid)
Benzoic acid	Synthetic auxins (action like indole acetic acid)
Quinolone carboxylic acid & aromatic acetates	Synthetic auxins (action like indole acetic acid)
Phenylpyrazole(azole)	GABA-gated chloride channel blockers_GABA-R(-)
Phosphorodithionate	Inhibition of lipid synthesis – not ACCase
Pyrazolium(azole)	Mitochondrial complex I electron transport inhibitors
Pyrethroid/Plant derived/ Pyrethrin	Sodium channel modulators_Na channel(+)
Pyrethroid/Synthetic_1	Sodium channel modulators_Na channel(+)
Pyrethroid/Synthetic_2	Sodium channel modulators_Na channel(+)
Pyridazinone	Mitochondrial complex I electron transport inhibitors
Pyrimidine	SBI: Class I_C14-demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)
Pyrrole(azole)	Uncoupler of oxidative phosphorylation
Sulfonylurea	Inhibition of acetolactate synthase (ALS)/acetohydroxyacid synthase (AHAS)
Sulfoximine	Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) competitive modulators
Sulphamide/electrophiles	Multi-site contact activity
Thiocarbamate	Inhibition of lipid synthesis – not ACCase
Triazine	Inhibition of photosynthesis at PS II
Triazole	SBI: Class I_C14-demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51)
Urea/amide	Inhibition of photosynthesis at PS II

parentemente simili lo siano veramente. Inoltre, vi è il problema di procedere in un modo semplificato, che sia in grado di procedere per un numero di sostanze che può anche essere ampio. Infine, il sistema deve essere flessibile, per adattarsi al meglio alla presenza di dati sperimentali.

In questo caso, i metodi *in silico* saranno differenti da quelli visti sopra. Non si tratta di predire le proprietà di sostanze senza tali dati sperimentali. Non si tratta di definire se una sostanza appartiene a una classe predefinita caratterizzata da una analogo comportamento biochimico. In questo caso i confini del raggruppamento sono incerti, e si parla quindi di metodi di *unsupervised clustering*. Non vi è una definizione oggettiva della famiglia, con i criteri di appartenenza, ma si chiede al computer di definirli.

Esistono vari metodi, ed è possibile giungere a raggruppamenti con numerosità variabile. Poiché lo scopo in questo caso è di sfruttare i dati sperimentali disponibili per alcuni rappresentanti del gruppo, evidentemente il criterio di definizione sarà opportunistico. Si procede con la divisione in famiglie in modo da avere per ogni famiglia almeno una sostanza con il dato sperimentale da sfruttare.

Un esempio di software di questo tipo è istChemFeat (<https://chm.kode-solutions.net>). Questo tipo di software si basa sulla similarità chimica, e raggruppa le molecole in famiglie di dimensione a scelta.

E' tuttavia possibile utilizzare anche metodi di similarità strutturale e poi definire delle matrici con ogni sostanza contro tutte le altre. Si ottengono in tal modo semplicemente delle matrici di similarità. A questo punto si tratta di andare a cercare la molecola più simile che disponga del dato sperimentale.

I metodi *in silico* per valutare il comportamento ambientale di miscele

I modelli di simulazione che utilizzano software specifici sono molto utili anche per valutare il comportamento ambientale di miscele. Pur immaginando una sorgente di esposizione puntiforme, ad esempio un reflujo di un impianto con una immissione in un fiume, è sicuramente possibile pensare che sostanze presenti in questa miscela di contaminanti abbiano delle caratteristiche di mobilità e persistenza differenti. In molti casi i modelli di questo tipo sono modelli numerici (e quindi diversi da quelli di cui abbiamo parlato in precedenza), dove si utilizzano informazioni sulla portata del corso idrico, le dimensioni della sezione, etc. Si impiegano informazioni sulla solubilità della sostanza, ad esempio, e sulla ripartizione nei sedimenti e così via. Un esempio di tale software è MERLIN-Expo. Con tale programma si possono quindi stimare per le varie sostanze d'interesse quanto un composto sarà in soluzione, quanto nel sedimento, quanto nell'organismo che vive nel sedimento, e poi procedere con i successivi passaggi nella catena trofica. Dato che MERLIN-Expo possiede anche modelli di tossicocinetica per l'uomo, è anche possibile stimare l'assunzione del contaminante in seguito all'esposizione del pesce contaminato per effetto dei processi sopra descritti, e se tale contaminante si ritroverà nel fegato.

Ecco quindi che metodi di simulazione di questo tipo consentono di valutare il comportamento delle diverse sostanze in quella che è la miscela iniziale. Ad esempio, nel caso del fiume, considerando la ripartizione acqua-sedimento, si possono evidenziare quanto le diverse sostanze si sposteranno a valle e saranno persistenti, ad esempio. Questo tipo di informazioni è molto importante per una valutazione corretta della co-esposizione, che può variare nello spazio e nel tempo.

In altri termini, il computer può servire non solo per fornire dati nel caso che manchino dati sperimentali sulla tossicità delle sostanze della miscela; il computer può anche essere utilizzato in caso in cui manchino informazioni sulle concentrazioni in un dato comparto, avendo a disposizione informazioni sulla fonte espositiva. EFSA fornisce dei modelli di simulazione di questo tipo, d'interesse per i pesticidi, ad esempio.

La valutazione del rischio da miscele attraverso l'uso di modelli *in silico*

I modelli di simulazione del comportamento ambientale, quali MERLIN-Expo e altri, si basano tipicamente su dati sperimentali su alcune sostanze per le quali esistano appunto i dati. Si pone quindi il problema di come procedere per le altre sostanze, per le quali non siano disponibili i dati sperimentali. Come si è visto, VEGA, ad esempio, può ovviare a questo problema. All'interno del progetto VERMEER, finanziato dalla CE all'interno del programma LIFE+, la piattaforma MERLIN-Expo per modellare l'esposizione, sia ambientale che interna, è stata combinata con la piattaforma VEGA, di cui abbiamo parlato sopra, che invece serve per valutare gli effetti. Il risultato è che, per la prima volta, si dispone in tal modo di un'unica piattaforma che integra sia i modelli di esposizione che di effetto. Questo è quanto serve per valutare il rischio.

I modelli tipo MERLIN-Expo non dispongono al loro interno di modelli predittivi di proprietà chimico-fisiche, ambientali, tossicologiche ed ecotossicologiche. Se la sostanza d'interesse è contenuta nel database del sistema, allora il software sarà in grado di effettuare la simulazione, altrimenti, per sostanze con parametri incogniti il sistema non sarà in grado di procedere.

Viceversa, VEGA è in grado di eseguire predizioni anche in mancanza di dati sperimentali, come dicevamo. È chiara quindi la differenza fra modelli predittivi e modelli di simulazione, di cui abbiamo parlato per le diverse tipologie di metodi computerizzati.

Integrando VEGA e MERLIN-Expo si è potuto ottenere per la prima volta un sistema predittivo per il rischio. VERMEER renderà disponibile nel 2021 una serie di sistemi integrati per la valutazione del rischio. Tali sistemi sono denominati LIFE SPHERA. Esiste già un sistema per i cosmetici (<https://www.vegahub.eu/portfolio-item/life-sphera-cosmolife/>) e ve ne saranno altri per le esposizioni attraverso il cibo oppure ambientale.

Il software specifico per i cosmetici effettua la valutazione per un prodotto cosmetico, ovvero per una miscela di sostanze presenti nel prodotto. I singoli ingredienti della miscela sono però valutati indipendentemente.

mente.

La figura 3 mostra l'esempio del software SPHERA per un prodotto cosmetico. In questo caso la miscela è una miscela intenzionale, del prodotto cosmetico che si intende valutare. Andrà definita la composizione, e quindi la percentuale di ogni ingrediente. Sarà pure da indicare il tipo di prodotto cosmetico. Infatti, gli scenari espositivi cambieranno per uno shampoo o per una crema da corpo.

I sistemi SPHERA nel caso dei contesti ambientali consentono quindi di valutare sia l'esposizione ad esempio lungo il fiume, sia gli effetti tossici sull'ecosistema acquatico.

Un caso specifico di LIFE SPHERA utilizzerà anche i modelli sul meccanismo d'azione e sarà quindi in grado di fornire una valutazione sull'effetto miscela secondo la procedura di CA.

Modelli *in silico* per predire effetti di miscele

Il caso più difficile è rappresentato da quello in cui ci si intende predire l'effetto di una miscela, includendo possibili attività agonistiche, sinergiche, antagonistiche, etc. Sopra abbiamo ragionato nelle circostanze in cui i valori delle singole sostanze siano eventualmente sconosciute, ma gestite comunque per ogni singola sostanza. La modalità di raggruppamento possibile avviene secondo criteri che si ipotizzano di CA, secondo il principio del MoA. In realtà, si possono

anche avere effetti devianti da questa ipotesi. Esistono alcuni modelli specifici, che, per attività ricollegabili tipicamente al legame a recettori nucleari, consentono di modellare attività agonistiche e antagonistiche (Mansouri et al., 2020). Tali modelli consentono già ora di identificare sostanze che siano agonistiche o antagonistiche, per attività come interferenti endocrini, ad esempio.

È possibile sviluppare modelli più potenti, che affrontino anche scenari di sostanze con comportamento differente nella stessa miscela. La difficoltà consiste principalmente nel fatto che i modelli *in silico* sono modelli statistici, anche se in misura diversa. In ogni caso, comunque, alla base del modello deve esistere una serie nutrita di esperimenti che rappresenti la situazione che si vuole modellare. Purtroppo, per eseguire studi sugli effetti miscela, servono molti esperimenti e la combinazione anche di un numero limitato di sostanze porta rapidissimamente all'esplosione esponenziale dei casi teoricamente da testare. Ecco che quindi questo costituisce il limite principale.

Esistono comunque alcune raccolte di studi sperimentali per la valutazione degli effetti miscela, e sulla base di queste esperienze, a tutt'oggi ancora molto circoscritte e sporadiche, sono stati sviluppati alcuni modelli. La validità e la applicabilità di tali modelli si riconduce alla specifica situazione studiata.

Ad esempio, un caso modellato è la tossicità delle miscele di pesticidi sulle api (Carnesecchi et al.,

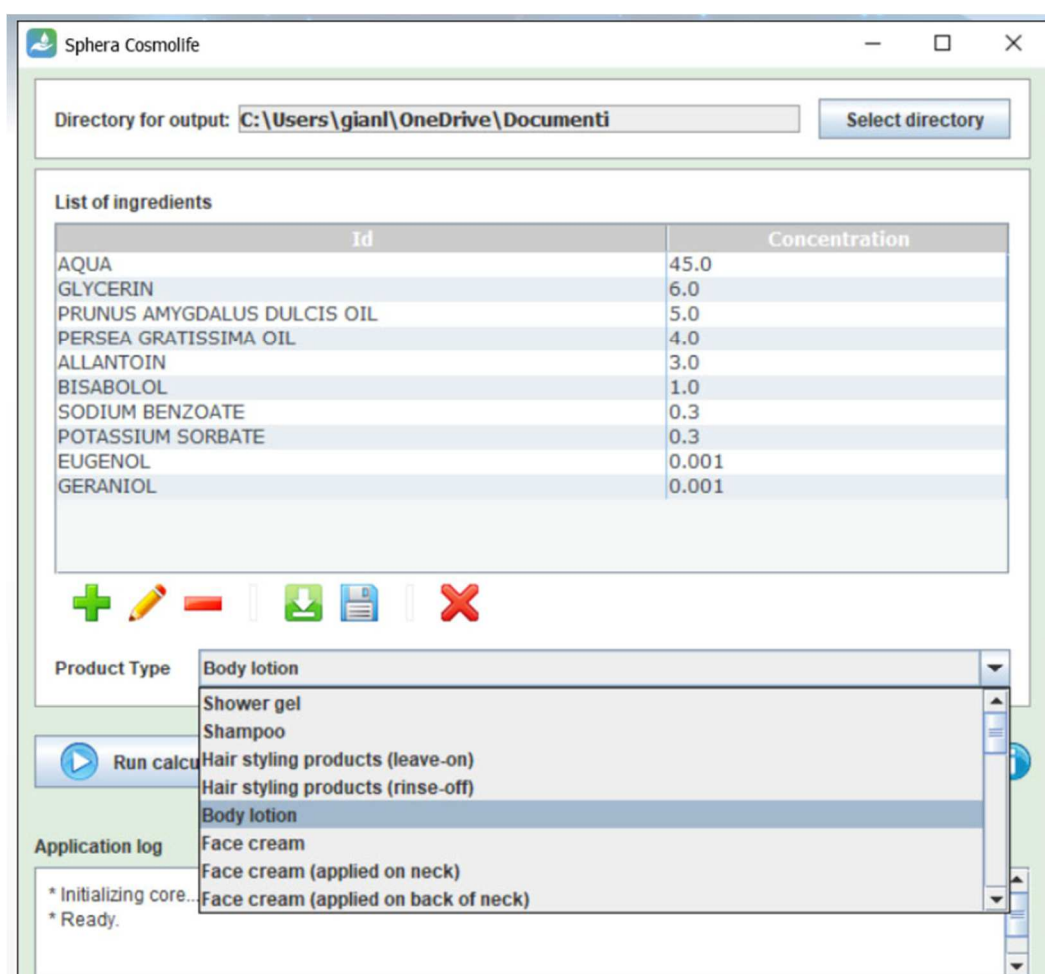


Figura 3. Un esempio di miscela valutata dal programma SPHERA COSMOLIFE.

2020). In questo studio gli input sono le strutture chimiche dei pesticidi, il loro meccanismo d'azione e l'effetto della miscela. Il modello è stato sviluppato attraverso il software CORAL, che si basa sulla struttura chimica rappresentato secondo il formato SMILES. Tale stringa di caratteri alfanumerici è tagliata dal software in piccoli frammenti, che sono usati per sviluppare il modello. Oltre alle informazioni chimiche, CORAL è in grado di utilizzare informazioni eclettiche e in questo caso è stata utilizzata l'informazione sul MoA. In particolare, si sono utilizzati i MoA come rappresentati in Tabella 1.

In casi di questo tipo è possibile quindi sviluppare un modello ad hoc che si svincola dai presupposti teorici di cui abbiamo parlato in precedenza. In altri termini, si lascia che il software sviluppi l'algoritmo proprio, che meglio si adatti alla serie di dati sperimentali. Questo approccio è molto diverso da quanto descritto sopra dove si ipotizzava che fossero valide una serie di assunzioni.

Un approccio statistico, come quello sopra descritto per la tossicità dell'effetto miscela delle api, è quindi in grado di modellare anche situazione dove si verificano effetti agonistici, antagonistici, e comunque deviazioni dall'effetto ipotizzabile sulla base di assunzioni teoriche. Tuttavia, la problematica della modellazione di effetti agonistici ed antagonistici è molto complessa. Infatti la casistica riportata è ancora scarsa, e mal si presta sia alla modellazione con approcci statistici, che a quella sotto il profilo teorico, utilizzando convalidate regole da implementarsi nelle circostanze riconosciute come alla base di tali effetti. Rimane il fatto che i modelli *in silico* consentono di verificare le diverse ipotesi e confermare o meno una modalità di effetto della miscela.

Conclusioni

Tutti noi siamo esposti a miscele, e questo richiede uno sforzo a comprendere, modellare e individuare priorità di studio e intervento per affrontare la sfida degli effetti delle miscele. Si moltiplicano gli sforzi in tale direzione sia nella comunità scientifica che nelle autorità (Sauer et al., 2020; More et al., 2019). EFSA nel 2021 renderà disponibile una nuova Guidaance sull'esposizione combinata. Il ruolo dei metodi *in silico* potrà essere molto importante. Tali metodi possono contribuire a semplificare le valutazioni di grandi numeri di sostanze, e a processare grandi quantità di scenari. Immaginare a mano tutte le possibilità è impossibile, e questo porta a semplificare le assunzioni, spesso a scapito dell'accuratezza della valutazione.

Invece, i metodi *in silico* contribuiscono in un modo che è insostituibile alla simulazione e predizione dei vari scenari. Questo avviene sotto il profilo espositivo, con una comprensione più fine del comportamento spazio-temporale delle sostanze. Inoltre, la capacità di predire le proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche è estremamente utile nel caso di valutare miscele con grandi numeri di sostanze, senza dover escludere dalla valutazione molte sostanze per questioni di tempo e risorse disponibili.

Modelli *in silico* possono coprire la carenza informativa sul meccanismo d'azione, che è alla base dell'im-

postazione comunemente adottata per la coesposizione secondo il principio di CA. Alcuni modelli *in silico* affrontano gli effetti agonistici e antagonistici. Ecco che quindi i metodi *in silico* si dimostrano insostituibili per la loro potenza.

Ma una ulteriore potenzialità è ancora tutta da esplorare e si preannuncia ancora più efficace. Le interazioni fra processi molteplici in cui gli aspetti tossicodinamici e tossicocinetici si intersecano è attualmente poco sfruttata e mal compresa. Alcuni progetti, quali il progetto OptiTox finanziato da EFSA vuole affrontare questa problematica. In questo terreno si può meglio comprendere la deviazione dal comportamento atteso di una miscela. Per la complessità della materia, i modelli *in silico* del futuro potranno, auspicabilmente, fornire un apporto prezioso.

Ringraziamenti

Si ringraziano i progetti LIFE VERMEER (LIFE16 ENV/IT/000167) e OptiTox (OC/EFSA/SCER/2018/01.2018-2022).

Riferimenti bibliografici

- Benfenati E., Lombardo A. (2020) VEGAHUB for Ecotoxicological QSAR Modeling. In: Ecotoxicological QSARs, Part of the Methods in Pharmacology and Toxicology book series (MIPT), Springer Protocols, Editor Kunal Roy, pages 759-787.
- Benfenati E (Ed.). *In silico Methods for Predicting Drug Toxicity*. Springer, New York, USA (2016), pp 1-483.
- Benfenati E, Belli M, Borges T, Casimiro E, Cester J, Fernandez A, Gini G, Honma M, Kinzl M, Knauf R, Manganaro A, Mombelli E, Petoumenou MI, Paparella M, Paris P, Raitano G. Results of a round-robin exercise on read-across. SAR and QSAR in Environmental Research, 2016, 27, 371-384
- Benfenati E, Chaudhry Q, Gini G, Dorne JL. Integrating *in silico* models and read-across methods for predicting toxicity of chemicals: A step-wise strategy. Environment International 2019; 131, 105060, doi: 10.1016/j.envint.2019.105060
- Carnesecchi E, Toropov AA, Toropova AP, Kramer N, Svendsen C, Dorne JL, Benfenati E. Predicting acute contact toxicity of organic binary mixtures in honey bees (*A. mellifera*) through innovative QSAR models. Science of the Total Environment, 2020, 704, 135302, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135302>
- Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen HK, More S, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rycken G, Schlatter JR, Silano V, Solecki R, Turck D, Benfenati E, Chaudhry QM, Craig P, Frampton G, Greiner M, Hart A, Hogstrand C, Lambre C, Luttik R, Makowski D, Siani A, Wahlstrom H,

- Aguilera J, Dorne J-L, Dumon AFt, Hempen M, Valtena Martinez S, Martino I, Smeraldi C, Terron A, Georgiadis N, Younes M. Guidance on the use of the weight of evidence approach in scientific assessments. *EFSA Journal* 2017; 15, 4971. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4971
- Kienzler A, Barron MG, Belanger SE, Beasley A, Embry MR. Mode of Action (MOA) Assignment Classifications for Ecotoxicology: An Evaluation of Approaches. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, 17, 10203–10211
- Mansouri K, Kleinstreuer N, Abdelaziz A M., Alberga D, Alves V M., Andersson P L., Andrade C H., Bai F, Balabin I, Ballabio D, Bay Benfenati E, Bhatarai B, Boyer S, Chen J, Consonni V, Farag S, Fourches D, García-Sosa A T., Gramatica P, Grisoni F, Grulke C M., Hong H, Horvath D, Hu X, Huang R, Jeliazkova N, Li J, Li X, Liu H, Manganelli S, Mangiatordi G, Maran U, Marcou G, Martin T, Muratov E, Nguyen D-T, Nicolotti O, Nikolov G. N, Norinder U, Papa E, Petitjean M, Piri G, Poroikov V, Qiao X, Richard A M., Roncaglioni A, Ruiz P, Rupakheti C, Sakkiah S, Sangion A, Schramm K-W, Selvaraj C, Shah I, Sild S, Sun L, Taboureau O, Tang Yun, Tetko Igor, Todeschini Roberto, Tong Weida, Trisciuzzi Daniela, Tropsha Alexander, VanDenDriessche George, Varnek A, Wang Z, Wedebye E, Williams A J., Xie H, Zakharov A, Zheng Z, Judson R S. CoMPARA: Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity. *Environ Health Perspectives*, 2020, 128, 027002, <https://doi.org/10.1289/EHP5580>
- More SJ, Hardy A, Bampidis V, Benford D, Hougaard Benneku S, Bragard C, J. Boesten J, T. I. Halldorsson TI, A. F. Hernandez-Jerez AF, M. J. Jeger MJ, H. K. Knutsen HK, K. P. Koutsoumanis KP, H. Naegeli H, H. Noteborn H, C. Ockleford C, A. Ricci A, G. Rycken G, J R Schlatter JR, V. Silano V, S S Nielsen SS, D. Schrenk D, Solecki R, Turck D, Younes M, Benfenati E, Castle L, Cedergreen N, Svendsen C, Testai E, Dujardin B, Kass GEN, Manini P, Jeddi MZ, Dorne JLCM, Hogstrand C. Guidance on harmonized methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of contributed exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal* 2019, 17, 5634. Doi: 10.2903/J.efsa.2019.5634
- Raitano G, Roncaglioni A, Manganaro A, Honma M, Sousselier L, Do Q-T, Paya E, Benfenati E. Integrating in silico models for the prediction of mutagenicity (Ames test) of botanical ingredients of cosmetics. 2019. *Computational Toxicology*, DOI: 10.1016/j.comtox.2019.100108
- Sauer UG, Barter RA, Becker RA, Benfenati E, Berggren E, Hubesch B, Hollnagel HM, Inawaka K, Keene AM, Mayer P, Plotzkel K, Skoglund R, Albert O. 21st Century Approaches for Evaluating Exposures, Biological Activity, and Risks of Complex Substances: Workshop highlights. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2020, 111, 104583. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104583>

Miscele di sostanze chimiche nell'ambiente: stato dell'arte della valutazione del rischio

a cura di

Emanuela Pace (*), ISPRA

RIASSUNTO

Ad oggi, oltre 100.000 sostanze chimiche sono presenti sul mercato europeo, il loro impiego nei settori produttivi e il loro utilizzo diffuso nella vita quotidiana hanno largamente contribuito al benessere economico e sociale. Tuttavia, nelle varie fasi del proprio ciclo di vita, dalla produzione all'uso, alla dismissione, queste sostanze possono essere rilasciate nell'ambiente, pertanto l'uomo e gli ecosistemi sono costantemente esposti a miscele di sostanze attraverso per esempio: acqua, cibo, prodotti di consumo. Per ridurre eventuali impatti negativi dovuti alla presenza di miscele nell'ambiente sono stati messi in atto a livello europeo diversi strumenti normativi. Tuttavia manca una visione integrata tra settori normativi e un'armonizzazione degli approcci metodologici di valutazione del rischio.

SUMMARY

To date, over 100,000 chemical substances are present on the European market, their use in production sectors and their widespread use in daily life have largely contributed to economic and social well-being. However, in the various phases of their life cycle, from production to use, to disposal, these substances can be released into the environment, therefore humans and ecosystems are constantly exposed to mixtures of substances through for example: water, food, consumer products. To reduce any negative impacts due to the presence of mixtures in the environment, various regulatory instruments have been put in place at European level. However, there is no integrated vision between regulatory sectors and a harmonization of risk assessment methodological approaches.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DELLE MISCELE

Dal punto di vista metodologico, la valutazione di rischio combina gli aspetti di pericolo a quelli di esposizione a determinate sostanze. Partendo dalla valutazione di pericolo, nel caso di una miscela, si procede considerando l'effetto tossicologico della stessa, nel suo insieme. Tuttavia in genere non si dispone di questo tipo di informazione, per cui si procede tenendo conto degli effetti tossicologici dei singoli componenti della miscela. L'approccio utilizzato è quello dell'additività di concentrazione, per cui l'effetto complessivo è dato dalla somma delle concentrazioni dei singoli componenti in relazione alla loro tossicità. Pertanto, anche sostanze presenti in concentrazioni non rilevanti possono contribuire alla tossicità complessiva. È stato verificato che il modello predice, con buona approssimazione, l'effetto miscela osservato sperimentalmente per componenti con modalità d'azione simili. Non tiene invece in considerazione gli effetti derivanti dalle possibili interazioni tra le diverse sostanze di una miscela. Queste possono infatti interagire per esempio influenzando il reciproco assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione. L'effetto tossicologico risultante, rispetto all'additività, può essere accresciuto, si parla in questo caso di sinergismo, o diminuito nel caso dell'antagonismo. Dati sperimentali dimostrano comunque che la sinergia è poco frequente. Questa inoltre, non è riconducibile a uno schema generale di valutazione e va dunque trattata caso per caso. Il modello dell'additività delle concentrazioni si è dimostrato quindi il più adeguato ed è raccomandato dalla Commissione Europea, anche

quando si ignorano le modalità d'azione dei componenti della miscela. Spesso non sono disponibili le informazioni necessarie per l'applicabilità del modello, quali quelle sulla relazione dose-effetto o sulla modalità di azione dei singoli componenti, in questi casi vari approcci metodologici, quali: modelli *in vitro*, *in silico*, di tossicocinetica, intervengono nel colmare le lacune conoscitive sulle sostanze.

La determinazione sperimentale della tossicità della miscela, d'altro canto, deve essere effettuata nel caso di composizioni non note, come nel caso di miscele che si ritrovano nell'ambiente. Tuttavia la procedura è poco praticabile in considerazione delle molteplici combinazioni possibili delle sostanze una volta rilasciate nell'ambiente. Al fine quindi di tenere conto del fatto che ogni sostanza immessa nell'ambiente può contribuire all'esposizione combinata dell'uomo e degli ecosistemi, nel marzo 2020 è stato proposto dalle Agenzie per le sostanze chimiche svedese e olandese, nell'ambito del Regolamento REACH sulle sostanze chimiche, un pratico approccio che consiste nell'adottare un ulteriore fattore di sicurezza nella valutazione di rischio delle sostanze, il MAF - *Mixture Assessment Factor*. Si tratta essenzialmente di diminuire di una determinata frazione, che sarà stabilita a priori, la concentrazione considerata sicura per la salute dell'uomo e dell'ambiente. Tale approccio, tuttora in discussione a livello europeo, si applicherebbe a tutte le sostanze immesse nel mercato, abbassando in tal modo il contributo di ogni singolo componente all'effetto tossicologico complessivo di una miscela.

Oltre agli aspetti di pericolosità, la valutazione di ri-

* emanuela.pace@isprambiente.it

schio considera l'esposizione alle sostanze. La valutazione dell'esposizione deve tenere conto di molteplici informazioni, tra queste: le fonti, che possono essere singole o molteplici; le vie di esposizione che si distinguono in orale, dermica e inalatoria; l'entità dell'esposizione; l'oggetto esposto, in particolare se si tratta di popolazione sensibile, così come se interessa un ecosistema già soggetto a fattori sfavorevoli come disponibilità di nutrienti o condizioni climatiche. Inoltre si deve tener conto della durata e della frequenza, ma anche della simultaneità o sequenzialità, infatti l'esposizione a sostanze diverse può essere separata nel tempo, ma può dare ancora origine a una coesposizione in particolare se si tratta di sostanze persistenti o che bioaccumulano. È stato inoltre dimostrato che la sequenzialità delle sostanze a cui si è esposti può modificare l'effetto tossicologico complessivo. Infine rilevante è anche la finestra temporale rispetto al ciclo di vita a cui si è esposti, considerato che alcune fasi di sviluppo sono particolarmente delicate e suscettibili ad interferenze esterne.

A supporto della valutazione, diversi modelli di esposizione forniscono una stima delle concentrazioni ambientali. Oltre a questi, i dati di monitoraggio rappresentano un valido contributo alla conoscenza degli impatti reali sull'ambiente e alla determinazione dei possibili trend. Il loro uso è raccomandato dal Parlamento Europeo al fine di una valutazione retrospettiva del rischio da poli esposizione.

IL SISTEMA NORMATIVO SULLA VALUTAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO DELLE MISCELE

Ad oggi la normativa europea non prevede una valutazione completa e integrata degli effetti cumulativi di una miscela. La valutazione del rischio si basa essenzialmente sulle singole sostanze e le singole fonti. In alcuni casi, normative settoriali prevedono la valutazione di miscele di composizione nota, come ad esempio per l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari, dei biocidi, dei farmaci e altre normative ancora. Tuttavia, le stesse normative non coprono l'esposizione combinata di sostanze chimiche disciplinate da altre norme settoriali. Manca quindi un sistema regolamentare che integri una gestione del rischio totale, quale somma del rischio derivante dall'esposizione a miscele diverse.

Per quanto riguarda inoltre, le miscele che si formano nell'ambiente, definite miscele non intenzionali, non si dispone ancora di una copertura normativa, sebbene queste rappresentino una condizione realistica a cui l'uomo e l'ambiente sono continuamente esposti.

Il Green Deal europeo, mediante la strategia per le sostanze chimiche sostenibili, si pone l'ambizioso obiettivo di azzerare l'inquinamento, convenendo sul fatto che l'esposizione a più sostanze, ciascuna al di sotto dei propri limiti di sicurezza di esposizione, può rappresentare un rischio. Diviene quindi necessario e urgente un approccio pragmatico che tenga in considerazione l'esposizione a miscele involontarie, al fine di estendere il più possibile un margine di sicurezza alla tutela della salute e dell'ambiente, nel normale svolgimento della vita di tutti i giorni.

Gli effetti combinati sulla salute umana: approccio valutativo attuale

a cura di

Raffaella Cresti, Leonello Attias (*), CNSC-ISS

RIASSUNTO

La valutazione del rischio per la salute umana associata all'esposizione a sostanze chimiche rappresenta un passaggio cruciale nei processi regolatori Europei. Un passaggio che però è stato finora prevalentemente incentrato sulla stima del rischio per la singola sostanza. La consapevolezza che gli effetti causati dalle sostanze chimiche sono correlati alla compresenza di più sostanze presenti nell'ambiente, nei prodotti e negli articoli trattati, ha evidenziato la necessità di studiare il cosiddetto effetto cocktail, divenendo negli anni argomento di grande interesse. A tal fine, diverse linee guida sono state elaborate per definire un approccio condiviso e basato su evidenze scientifiche.

Analogamente, la valutazione degli effetti e/o dell'esposizione combinati è stata anche implementata nelle più recenti norme comunitarie in vigore nel contesto dei *chemicals*. In particolare, il Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH) ed il Regolamento (UE) n. 528/2012 sui biocidi (*Biocidal Product Regulation*, BPR) che, pur con un livello di approfondimento diverso, definiscono un primo approccio metodologico attraverso il quale valutare il rischio derivante dallo scenario realistico di uso di una molteplicità di sostanze.

SUMMARY

Human health risk assessment associated to the exposure to chemicals represents a key issue in European regulatory processes. This step, however, has been so far mainly focused on estimating the risk due to single substance. The awareness that the effects caused by chemicals are related to the coexistence of multiple substances in the environment, in the products and in the treated articles, has highlighted the need to study the so-called cocktail effect, becoming an issue of great interest over the years. To this end, several guidelines have been developed to define a shared approach based on scientific evidence.

Similarly, the assessment of the combined effects and / or exposure has also been implemented in the most recent Community legislation in force in the context of chemicals. In particular, Regulation (EC) no. 1907/2006 and Regulation (EU) n. 528/2012 on biocides which, even with different level of detail, define a first methodological approach by which to assess the risk deriving from the realistic scenario of multiple substances.

Introduzione

L'uomo e l'ambiente sono esposti ad una molteplicità di sostanze chimiche; fenomeno che ha nel tempo accresciuto la preoccupazione rispetto ai potenziali effetti avversi dovuti alle possibili interazioni tra le sostanze presenti, in particolare, all'interno dei prodotti chimici oppure negli articoli trattati di uso comune. Ciononostante, gli approcci regolatori si basano generalmente sulla valutazione del rischio associato alla singola sostanza chimica. Per venire incontro ad una maggiore sensibilità rispetto allo studio degli effetti causati da cocktail di sostanze, si è reso necessario affrontare in modo sistematico la mancanza di una metodologia condivisa per la valutazione degli effetti o dell'esposizione combinati.

A diversi livelli, le Istituzioni Europee (Consiglio dei Ministri dell'Ambiente, Parlamento e Commissione Europea) nel corso degli anni si sono impegnate attraverso atti normativi ad avviare un processo con l'obiettivo di sviluppare un adeguato approccio alla valutazione dei rischi associati all'utilizzo di miscele chimiche (1; 2; 3; 4). Nel 2011, i tre comitati scientifici indipendenti coinvolti nella valutazione dei rischi delle sostanze chimiche⁽¹⁾ hanno presentato un primo esaustivo documento che raccoglieva principi e metodi da adottare nella valutazione di miscele di sostanze chimiche (3). Specificatamente, il documento sot-

tolinea la mancanza di una metodologia condivisa, giungendo ad alcune importanti conclusioni tra cui la principale è che l'interazione tra le singole sostanze possa influenzare in modo rilevante la tossicità complessiva della miscela.

Si riassumono di seguito alcune delle conclusioni più rilevanti a cui giunge il documento dei tre comitati.

Le sostanze nella miscela agiscono attraverso tre diverse modalità di azione (*Mode of Action*, MoA): meccanismo di azione simile⁽²⁾; meccanismo di azione indipendente⁽³⁾; meccanismo di interazione per sinergismo o antagonismo⁽⁴⁾. Il meccanismo di azione

⁽¹⁾ SCHER - Il comitato scientifico per i rischi sanitari e ambientali; SCCS - Comitato scientifico per la sicurezza dei consumatori; SCHENIR - Il comitato scientifico che si occupa valutazione dei nuovi e futuri rischi per la salute

⁽²⁾ Le sostanze hanno simile meccanismo di azione che differisce solo per la potenza; quindi l'effetto combinato è maggiore. Si applica il metodo dell'additività di dose/concentrazione

⁽³⁾ Le sostanze hanno un diverso meccanismo di azione e quindi gli effetti tossicologici sono indipendenti e vengono considerati nel loro complesso al momento della valutazione. Si applica il metodo dell'additività di risposta/ additività degli effetti

⁽⁴⁾ L'effetto combinato di più sostanze è maggiore o minore rispetto a quello atteso sulla base dell'additività dose/concentrazione o risposta

* leonello.attias@iss.it

simile implica una differenza nella sola potenza dell'effetto che amplifica l'effetto complessivo; mentre il meccanismo di azione indipendente implica che le singole sostanze non influiscono sulla tossicità delle altre presenti nella miscela; le interazioni per sinergismo o antagonismo possono variare in funzione della dose, della via(e) di esposizione, della durata dell'esposizione e degli organismi bersaglio.

Inoltre, la linea guida evidenzia la necessità di stabilire dei criteri di screening per identificare le miscele potenzialmente più preoccupanti, dal momento che sono infinite le possibili combinazioni di sostanze ed è quindi opportuno stabilire un ordine di priorità.

La mancanza di informazioni circa l'esposizione a miscele insieme a conoscenze dei meccanismi di azione (*Mode of Action*, MoA) disponibili per un limitato numero di sostanze nelle miscele, rappresentano un ulteriore argomento di approfondimento. Per superare alla carenza di dati sul MoA, il documento suggerisce come possibile soluzione di applicare del metodo dell'additività della dose/concentrazione azione, assumendo che le sostanze agiscano attraverso un meccanismo simile. Eventuali possibili interazioni tra le sostanze, tali da confutare l'ipotesi del MoA simile, è comunque sempre affidata all'*expert judgement*.

Infine, la linea guida propone un processo iterativo con l'adozione di gradualità considerazioni inerenti sia gli effetti che l'esposizione, da implementare anche attraverso un incremento dei dati richiesti (approccio case-by-case). A supporto del lavoro degli esperti nello stabilire quali azioni da intraprendere è stato elaborato un albero decisionale.

In ambito regolatorio, la definizione di esposizione combinata può descrivere tre diversi scenari:

- a. esposizione a diverse sostanze contenute in un singolo prodotto;
- b. esposizione a una singola sostanza da fonti diverse (ad es. prodotti); oppure
- c. esposizione a diverse sostanze da diverse fonti, rilasciate in tempi e luoghi diversi. L'esposizione a diverse sostanze chimiche può portare a effetti più gravi rispetto all'esposizione alle singole sostanze chimiche.

Attualmente alcune norme Europee per le sostanze chimiche hanno già sviluppato, o stanno definendo, degli approcci per la valutazione degli effetti combinati associati alla presenza di più sostanze chimiche all'interno di una singola miscela, tra queste il Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH) ed il Regolamento (CE) n. 528/2012 sui biocidi (*Biocidal Product Regulation*, BPR) (5; 6).

IL REGOLAMENTO REACH

Il REACH non stabilisce alcun obbligo esplicito al produttore/importatore di miscele di valutare il rischio combinato delle singole sostanze presenti nella miscela, ovvero il rischio dovuto all'esposizione simultanea a più sostanze che potrebbero produrre effetti additivi. Tuttavia, in alcuni casi il formulatore di una miscela è tenuto a considerare l'additività degli effetti così da garantire un'adeguata informazione e comunicazione in merito alle modalità di implementazione

dei sistemi per il controllo dell'esposizione. Tale comunicazione si esprime attraverso la scheda di dati di sicurezza (SDS) della miscela. Si rende, pertanto, necessario effettuare valutazioni parallele e multiple dell'esposizione delle singole sostanze dimostrando, laddove sia possibile assumere che queste abbiano un MoA simile, l'adeguatezza delle misure di controllo del rischio mediante il metodo della combinazione dei rapporti di caratterizzazione del rischio.

In merito alla comunicazione lungo la catena di approvvigionamento, con un particolare focus alla tematica dell'esposizione alle miscele, il REACH prescrive le modalità attraverso cui questa deve essere condotta per garantirne l'efficacia.

L'ECHA in collaborazione con le organizzazioni industriali di settore e gli Stati Membri ha sviluppato diverse metodologie al fine di migliorare e armonizzare la comunicazione nella catena di approvvigionamento. In particolare, per la comunicazione a monte (dall'utilizzatore a valle al dichiarante) la procedura sviluppata, prevede che gli utilizzatori di miscele sviluppino delle mappe degli usi (MU) per rendere disponibili ai loro fornitori/dichiaranti informazioni in merito agli usi e alle condizioni d'uso. Le MU sono costituite da una raccolta armonizzata e strutturata di informazioni inerenti usi e condizioni di utilizzo delle sostanze chimiche e sono state elaborate dalle organizzazioni di settore degli utilizzatori a valle con l'obiettivo di migliorare la qualità delle informazioni comunicate lungo la catena di approvvigionamento nonché l'efficienza del processo di comunicazione.

Le MU consentono ai dichiaranti di effettuare le valutazioni della sicurezza chimica (*Chemical Safety Assessment*, CSA) e di sviluppare gli scenari di esposizione (*Exposure Scenario*, ES) tenendo conto di condizioni di uso pertinenti e rappresentative di specifici settori di utilizzatori a valle.

Ne consegue che le MU consentono di fornire agli utilizzatori a valle ES che riflettono l'uso reale e risultano quindi utili per le comunicazioni inviate dai fornitori. Pertanto, consentendo agli utilizzatori a valle di trasmettere ai fornitori informazioni armonizzate e coerenti necessarie per elaborare ES, i dati raccolti dalle MU aumentano la probabilità che i dichiaranti includano gli usi degli utilizzatori a valle nelle proprie registrazioni.

Per migliorare la comunicazione a valle (dal dichiarante all'utilizzatore a valle), nell'ambito delle attività svolte dall'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (*European Chemicals Agency*, ECHA) per l'implementazione del REACH, sono stati elaborati modelli di ES per le sostanze. Gli ES forniscono informazioni in merito alle azioni da porre in essere per il controllo dell'esposizione a sostanze pericolose durante il loro utilizzo, ad es. attraverso misure di gestione del rischio e/o condizioni operative.

I fornitori di miscele pericolose devono identificare e comunicare all'interno della catena di approvvigionamento le informazioni pertinenti a partire dagli ES. A tal fine, per l'identificazione di queste informazioni sono stati sviluppati due diversi approcci:

- il metodo definito delle "Informazioni sull'uso sicuro delle miscele" (*Safe Use of Mixtures Infor-*

mation, SUMI); e

- la “Metodologia di Identificazione dei Componenti Principali” (*Lead Component Identification, LCID*).

I SUMI sono documenti elaborati dalle organizzazioni di settore che identificano le misure di gestione del rischio per prodotti e usi specifici afferenti al settore stesso e contengono informazioni sull'uso sicuro delle miscele trasmesse attraverso la catena di approvvigionamento utilizzando un formato concordato. Il formulatore verifica all'interno del SUMI le informazioni sull'uso sicuro appropriate per il proprio prodotto e la coerenza con gli ES che ha ricevuto dal fornitore e se del caso aggiunge la SUMI alla SDS della miscela.

Quando il formulatore non dispone di adeguate informazioni sull'uso sicuro delle miscele, utilizza l'approccio LCID identificando i componenti principali del prodotto da cui deriva le indicazioni circa l'uso sicuro per l'intera miscela.

Pertanto, le informazioni in merito all'uso sicuro delle miscele, derivate dalla valutazione del rischio, vengono comunicate attraverso le SDS, nello specifico le informazioni possono essere integrate all'interno del testo (ad es. sezione 8); oppure allegando il SUMI o gli ES delle singole sostanze se disponibili realizzando di fatto SDS "estese" per le miscele.

REGOLAMENTO BIOCIDI

Diversamente dal REACH, il BPR prescrive che l'autorizzazione all'immissione in commercio di un prodotto biocida possa essere rilasciata solo se in fase di valutazione non sia stato evidenziato alcun rischio associato alla presenza di eventuali altre sostanze che destino preoccupazione oltre al principio attivo, effettuando, se necessario, una valutazione del rischio combinato.

L'art. 3(f) del BPR fornisce la definizione di “sostanza che desta preoccupazione” (*Substance of Concern; SoC*) e i criteri per la sua identificazione. In particolare, la sostanza che desta preoccupazione è una “qualsiasi sostanza, diversa dal principio attivo, che possiede un'intrinseca capacità di provocare effetti negativi [...] sull'uomo [...], sugli animali o sull'ambiente e che è contenuta o prodotta in un biocida in concentrazione sufficiente a costituire un rischio di tale effetto”.

Ed i criteri per identificare la SOC sono:

- la sostanza è classificata (Direttiva 67/548/CEE) e contribuisce alla classificazione del prodotto ai sensi della Direttiva 1999/45/CE (artt. 5; 6; 7);
- la sostanza è classificata contribuisce alla classificazione del prodotto ai sensi del Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) (7);
- la sostanza soddisfa i criteri POP ai sensi del Regolamento (CE) n. 850/2004 (8) oppure PBT/vPvB ai sensi Regolamento REACH (allegato XIII)

In tutti questi casi deve essere effettuata una valutazione dei rischi quali-/quantitativa secondo un approccio definito “schema a bande” (*“Banding evaluation scheme”*) che, in funzione della classificazione del prodotto, può prescrivere la semplice individuazio-

ne di misure di gestione del rischio (ad es. etichettatura del prodotto) fino ad arrivare, per le bande di pericolo più elevate, alla definizione di rapporti di rischio (9).

La linea guida “*Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume III Human Health - Assessment & Evaluation (Parts B+C)*” (v. 9) per l'identificazione di una SoC identifica, oltre ai criteri individuati dal BPR, ulteriori cinque criteri aggiuntivi e indica la metodologia da applicare per la stima quali-/quantitativa dei rischi associati all'uso del prodotto biocida nei casi in cui vengano identificate una o più SOC. La valutazione del rischio combinato deve essere obbligatoriamente di tipo quantitativo nel caso di prodotti biocidi in cui la SoC soddisfi il 2° criterio aggiuntivo.

Il 2° criterio aggiuntivo identifica come SOC un principio attivo in valutazione o valutato ai sensi del BPR per una tipologia di prodotto diversa da quella in esame, presente nel prodotto come co-formulante alla concentrazione maggiore o uguale dello 0.1%. Il documento prescrive una valutazione del rischio quantitativa nei casi in cui la SOC soddisfi il 2° criterio aggiuntivo poiché, diversamente da quanto accade per altre sostanze identificate SOC, per i principi attivi che rientrano nel programma di revisione del BPR sono disponibili valori tossicologici di riferimento già valutati (*peer-reviewed*) secondo criteri e linee guida elaborati per l'implementazione del regolamento stesso, garantendo così l'affidabilità e l'armonizzazione della valutazione.

La linea guida sottolinea la necessità di focalizzarsi sulle metodologie attualmente disponibili che consentono di effettuare una stima dell'esposizione combinata nei casi di esposizione a più sostanze provenienti da una stessa fonte di rilascio e/o uso, la cui tossicità si esprima attraverso effetti sistemici.

Soddisfatte queste condizioni, il valutatore ha a disposizione per i singoli componenti della miscela un'ampia base di dati tossicologici già *peer-reviewed* nel contesto BPR; può applicare come background scientifico la linea guida “*Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures (2012)*” (v. 3) e il suo approccio iterativo (“*tiered approach*”).

Nei casi di esposizione combinata a più sostanze, provenienti però da diverse fonti di rilascio e/o usi, o di esposizione aggregata, intesa come esposizione a una singola sostanza proveniente da diverse fonti di rilascio e/o usi, la linea guida rimanda ad ulteriori approfondimenti e sviluppi da affrontare in futuro nel documento stesso. Per la valutazione del rischio combinato in ambito BPR, si parte dall'assunzione che gli effetti delle singole sostanze presenti all'interno della miscela vadano considerati di default concentrazione- o dose-additivi; in altre parole che le sostanze agiscano attraverso un MoA simile.

Il primo passaggio (*Tier 1*) valuta l'accettabilità del rischio per le singole sostanze, calcolando per ciascuna di esse un *Hazard Quotient (HQ)*⁽⁵⁾, dato dal rapporto tra la dose interna di esposizione e il livello di esposizione accettabile (*Acceptable Exposure Level, AEL*).

⁽⁵⁾ *Hazard Quotient (HQ) = Internal Exposure / AEL*

Se l'ipotesi che le sostanze agiscano attraverso MoA simile è verificata (i.e., additività della dose/concentrazione), e quindi non sono stati individuati effetti sinergici, gli effetti tossicologici combinati dei singoli componenti della miscela vengono considerati nel in una valutazione di secondo livello (Tier 2). Questa ipotesi può essere considerata come uno scenario di caso peggiore rispetto all'ipotesi di sostanze ad azione indipendente.

La valutazione di Tier 2 applica il metodo dell'additività della concentrazione/dose calcolando l'HQ dei singoli componenti che vengono sommati tra loro determinando un *Hazard Index (HI)*⁽⁶⁾. Nel caso in cui HI sia superiore al valore di riferimento di 1, vengono prescritte le appropriate RMM oppure si reitera il processo con una valutazione di terzo livello (Tier 3).

La valutazione di Tier 3 è più complessa e si basa su assunzioni più realistiche, e ha lo scopo di confermare o confutare la correttezza dell'ipotesi iniziale secondo la quale le sostanze della miscela agiscono attraverso un MoA simile. Innanzitutto, il Tier 3A stima un HI (**Approx. HI_{to}**)⁽⁷⁾ sommando tra loro gli HI delle singole sostanze che hanno lo stesso organismo target e/o meccanismo di azione senza però definire un AEL specifico per quell'organismo target/meccanismo di azione.

In caso di rischio, il successivo *refinement* a livello di Tier 3B prevede che la valutazione definisca un AEL specifico per l'organismo target e/o meccanismo di azione identificato per il gruppo di sostanze in esame. Infine, a livello di Tier 3C si applicano i *refinements* per affinare HI_{to} considerando informazioni specifiche sul meccanismo di azione. Se quest'ultimo *refinement* non è applicabile, poiché il MoA non è noto, l'ipotesi iniziale (i.e., le sostanze agiscono attraverso un MoA simile) risulta non verificata e le sostanze devono essere considerate come aventi meccanismi di azione indipendenti e il rischio viene stimato solo attraverso il criterio stabilito al Tier 1.

CONCLUSIONI

Il contesto regolatorio europeo sui *chemicals* negli anni ha affrontato il problema relativo al rischio associato ad un'esposizione combinata a più sostanze chimiche. Ciò ha portato all'elaborazione di documenti tecnici implementati nelle più recenti normative quali la normativa di prodotto REACH e la normativa di settore sui biocidi. Entrambe le norme, pur con un livello di approfondimento diverso, definiscono un primo approccio metodologico attraverso il quale valutare il rischio derivante dallo scenario realistico di uso di una molteplicità di sostanze.

Il REACH, pur non prescrivendo nessun obbligo di effettuare una valutazione del rischio combinato per le singole sostanze presenti in una miscela, attribuisce ad alcuni attori della catena di approvvigionamento alcuni obblighi. In primo luogo, il formulatore è chiamato a tenere conto di potenziali fenomeni correlati all'additività ed elaborare la corretta comunicazione lungo la catena di approvvigionamento sull'uso

sicuro della sua miscela, così da garantire le informazioni sull'adeguato controllo dell'esposizione, ad esempio attraverso la SDS della miscela. A tal fine, sono stati elaborati utili strumenti che consentono di effettuare una valutazione del rischio adeguata anche per le miscele. Tra questi strumenti le mappe d'uso definiscono le condizioni di utilizzo delle sostanze/miscele e sono necessarie a costruire gli scenari di esposizione. In base a ciò, sono state sviluppate metodologie quali il SUMI e l'LCID che consentono, rispettivamente, di effettuare la valutazione dell'uso sicuro per la miscela in quanto tale oppure individuando il/i componente/i principale/i da cui recuperare le informazioni per il controllo del rischio dalle singole sostanze che compongono la miscela.

Il Regolamento sui biocidi prescrive che la valutazione del rischio deve essere effettuata non solo per il principio attivo biocida ma anche per qualsiasi altra sostanza che identificata come "sostanza che desta preoccupazione". Il BPR definisce chiaramente cosa si intende per "sostanza che desta preoccupazione" (*Substance of Concern*, SoC) e quali debbano essere i criteri per la sua identificazione. Al fine di garantire un maggiore livello di sicurezza, la linea guida per l'implementazione del BPR definisce ulteriori 5 criteri addizionali oltre a stabilire un approccio metodologico attraverso il quale effettuare una valutazione quali/quantitativa del rischio combinato e associato all'uso di un prodotto biocida

Riferimenti bibliografici

- Europa. Combination Effects of Chemicals. Council of the European Union. 17820/09, ENV 921 CHIMIE 103 COMPET 530 SAN 376. Brussels, 23 December 2009. Disponibile all'indirizzo: <https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-17820-2009-INIT/en/pdf>; ultima consultazione 31/01/2021
- Europa. State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report. Executive Summary 22 December 2009. Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf; ultima consultazione 31/01/2021
- Europa. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Scientific Committee on Health and Environmental Risks, SCHER; Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR; Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS. European Commission DG Health & Consumers. European Union, 2012. ISBN 978-92-79-30700-3. doi:10.2772/21444. Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf; ultima consultazione 31/01/2021
- Europa. Comunicazione della Commissione al Consiglio. Effetti Combinati delle Sostanze Chimiche. Miscele Chimiche. Bruxelles, 31.5.2012 COM (2012) 252 final. Disponibile all'indirizzo: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0252&from=EN>; ultima consultazione 31/01/2021

⁽⁶⁾ *Hazard Index (HI)* = $\sum HQ_{a,s}$.

⁽⁷⁾ *Approx. HI_{to}* = $\sum HQ_{to}$

Europa. Regolamento (CE) 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la Direttiva 1999/45/CE e che abroga il Regolamento (CEE) 793/93 del Consiglio e il Regolamento (CE) 1488/94 della Commissione, nonché la Direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 396 del 30 dicembre 2006.

Europa. Regolamento (UE) n. 528/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2012, relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 167/1, 27/6/2012.

Europa. Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 353/1, 31/12/2008

Europa. Regolamento (CE) N. 850/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo agli inquinanti organici persistenti e che modifica la direttiva 79/117/CEE

Europa. Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume III Human Health - Assessment & Evaluation (Parts B+C) Version 4.0 December 2017. Disponibile all'indirizzo: https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/biocides_guidance_human_health_ra_iii_part_bc_en.pdf/30d53d7d-9723-7db4-357a-ca68739f5094; ultima consultazione 31/01/2021

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop—25 giugno 2020

RACCOLTA ABSTRACT



Con lo sviluppo delle conoscenze relative all'inquinamento ambientale e dei suoi effetti avversi sugli ecosistemi, sono state introdotte su scala nazionale ed europea diverse normative volte a garantire la tutela dell'ambiente e della salute umana attraverso l'uso sicuro delle sostanze chimiche. Il Regolamento (CE) n.1907/2006, "Regolamento REACH", prevede che venga effettuata una valutazione preliminare dei rischi per l'uomo e per l'ambiente delle sostanze chimiche prima di una loro immissione sul mercato europeo.

Tuttavia il sistema legislativo dell'Unione europea non prevede una valutazione integrata degli effetti combinati delle sostanze chimiche ma si basa sulla gestione del rischio di singoli contaminanti. Nella realtà gli organismi viventi sono esposti contemporaneamente a più sostanze (miscele) e la sola analisi dell'esposizione a singole sostanze chimiche potrebbe non garantire una sufficiente sicurezza per quanto riguarda lo stato di qualità dei comparti ambientali e la tutela della salute umana.

La tossicità delle miscele di sostanze chimiche e le relative metodologie di valutazione dell'esposizione combinata sono di grande interesse sia a livello europeo che internazionale. A tutt'oggi tuttavia non vi è ancora un orientamento unico a livello europeo per la valutazione degli effetti combinati delle sostanze chimiche.

Risulta, dunque, di primaria importanza la definizione di un approccio per la valutazione delle miscele, anche attraverso l'utilizzo di dati ambientali di contaminazione.

L'evento, oltre ad avere lo scopo di presentare i risultati dello studio affidato dal Ministero dell'Ambiente all'Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA) del CNR per l'individuazione di un approccio metodologico per la valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze, è stata l'occasione per un confronto e aggiornamento sulla materia, in vista delle azioni che la Commissione europea avvierà nei prossimi mesi.

Comitato Organizzatore

Paola Grenni IRSA - CNR

Anna Barra Caracciolo IRSA - CNR

Serena Santoro Direzione Generale per il Patrimonio Naturalistico (PNA) del Ministero dell'Ambiente

Susanna Lupi Direzione PNA del Ministero dell'Ambiente

Bruna De Amicis Direzione PNA del Ministero dell'Ambiente

Contatti: sostanzechimiche@minambiente.it

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

Elenco interventi

- **Saluti istituzionali** Giuseppe Mascolo (Direttore dell'IRSA-CNR)
- **Apertura del workshop** Carlo Zaghi (Direttore PNA del Ministero dell'Ambiente)
- **Il quadro normativo di riferimento** Serena Santoro (Ministero dell'Ambiente)
- **Introduzione alla valutazione degli effetti combinati delle miscele** Paola Grenni (IRSA-CNR)
- **Le miscele nelle linee guida per la valutazione di impatto sanitario: aspetti tossicologici ed ecotossicologici** Mario Carere, Emanuela Testai (ISS)
- **Materiali di riferimento composti da miscele di sostanze emergenti a supporto dei metodi ecotossicologici (EBM) per la classificazione delle acque superficiali** Stefania Balzamo, Monica Potalivo (ISPRA)
- **Utilizzo di metodi in silico e read-across per la valutazione di miscele** Emilio Benfenati - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri –IRCCS
- **Valutazione del rischio da miscele di sostanze chimiche: proposta metodologica e casi studio** Antonio Finizio (Università degli Studi di Milano – Bicocca)
- **Applicazione territoriale dell'approccio metodologico** Andrea Di Guardo (Università degli Studi di Milano – Bicocca), Anna Bruna Petrangeli (IRSA-CNR)
- **Metodi innovativi di analitica per le miscele** Sara Valsecchi, Stefano Polesello (IRSA-CNR)
- **Miscele di sostanze chimiche nell'ambiente: stato dell'arte della valutazione del rischio** Emanuela Pace (ISPRA)
- **Gli effetti combinati sulla salute umana: approccio valutativo attuale** Leonello Attias, Raffaella Cresti (ISS)
- **EFSA activities on risk assessment of combined exposure to multiple chemicals** Jean Lou Dorne (EFSA)
- **Discussione e prospettive future** Anna Barra Caracciolo (IRSA-CNR) .

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

Saluti istituzionali

Giuseppe Mascolo

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR)

Con piacere introduco i lavori del workshop, ospitato dall'IRSA-CNR, che tratta di una tematica di grande attualità. Infatti è ben noto l'impatto degli inquinanti organici nelle acque, il cui numero oggetto di vari monitoraggi è aumentato nel corso degli anni. Infatti la normativa sulle acque a livello nazionale ed internazionale ha recentemente incluso una "Watch list", lista di sostanze da monitorare che eventualmente possono essere considerate in future normative che regolano la qualità delle acque. Tra i contaminanti considerati nella lista ve ne sono anche alcuni denominati inquinanti emergenti (nei quali rientrano, ad esempio, i residui di farmaci). Un'altra categoria di contaminanti che recentemente vengono analizzati dai centri di ricerca sono i prodotti di degradazione dei contaminanti organici. Questi ultimi si generano dai contaminanti organici a seguito dei trattamenti dei reflui o anche da fenomeni naturali. Questo ha portato le indagini a livello di ricerca scientifica di denominare altre categorie di sostanze con i termini "known unknown" (quali i metaboliti di inquinanti organici conosciuti) o "unknown unknown" (quali composti completamente inaspettati).

Anche per l'impatto tossicologico (sulla salute umana) di matrici ambientali è importante considerare la presenza di miscele di contaminanti mentre in precedenza erano, invece, veniva considerato l'impatto tossicologico delle sostanze considerate singolarmente. Qui si inserisce il workshop, che sottolinea l'importanza della valutazione della tossicità delle miscele. Il workshop comprende interessanti presentazioni, frutto anche di una convenzione con il Ministero dell'Ambiente che si sta concludendo.

Apertura del workshop

Carlo Zaghi

Direttore Generale della Direzione generale per il patrimonio naturalistico - Ministero dell'Ambiente

L'Unione europea si è dotata dal 2007, anno di entrata in vigore del regolamento (CE) n.1907/2006 ("regolamento REACH"), di un sistema innovativo per la gestione dei rischi delle sostanze chimiche in commercio, basato sull'acquisizione sistematica e la valutazione dei dati sperimentali sulle proprietà di ciascuna sostanza, dei relativi pericoli e dei rischi per la salute umana e per l'ambiente.

Si tratta di una tra le normative più avanzate al mondo, forse la più avanzata, in materia di valutazione e gestione dei rischi ambientali e sanitari associati all'uso delle diverse migliaia di sostanze chimiche utilizzate nei processi industriali.

Tuttavia, il regolamento REACH prevede che le richieste di dati e la valutazione del rischio siano focalizzate sulle singole sostanze, pur essendo evidente come i lavoratori/consumatori e i comparti ambientali siano esposti contemporaneamente a più sostanze, con effetti additivi o sinergici che

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

andrebbero opportunamente tenuti in considerazione.

La comunità scientifica e la comunità amministrativa sono ormai consapevoli che la valutazione degli effetti dovuti all'esposizione a singole sostanze può non garantire una sufficiente sicurezza per la salute umana e per l'ambiente. Per rispondere alla necessità di migliorare la gestione dei rischi delle sostanze chimiche in commercio, le istituzioni europee hanno intrapreso diverse azioni per mettere a punto un approccio adeguato alla valutazione degli effetti combinati di miscele di più sostanze.

A questo riguardo, il 14 ottobre 2020 la Commissione europea ha presentato la Comunicazione sulla "Strategia in materia di sostanze chimiche per la sostenibilità – Verso un ambiente privo di sostanze tossiche" (COM 2020 667 final) che prevede l'introduzione di disposizioni specifiche per affrontare in modo coerente e armonizzato gli effetti combinati delle miscele di sostanze.

Il Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, ora Ministero della transizione ecologica, ha avviato a partire dal 2018 un'attività di collaborazione con l'Istituto di Ricerca Sulle Acque del CNR (IRSA) del CNR, per l'individuazione di un approccio metodologico per la valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche sull'ambiente.

I risultati dello studio condotto dall'IRSA-CNR e il contributo costante dei soggetti coinvolti nel processo di miglioramento degli strumenti di valutazione e gestione del rischio delle sostanze chimiche (rappresentanti ed esperti del mondo produttivo, di istituti di ricerca e di amministrazioni centrali e regionali) potranno fornire un importante supporto alle Autorità nazionali ed europee nel processo avviato per la definizione di una legislazione unionale aggiornata, che tenga conto degli effetti combinati delle miscele di sostanze

Il quadro normativo di riferimento

Serena Santoro

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Direzione Generale per il Patrimonio Naturalistico

Nell'ambito della gestione delle sostanze chimiche a livello europeo è stato messo a punto un sistema integrato (Regolamento (CE) n.1907/2006 - "Regolamento REACH") per valutare i rischi delle sostanze immesse sul mercato, assicurandone il controllo e la corretta gestione e promuovendo processi di sostituzione delle sostanze che destano maggiore preoccupazione dal punto di vista ambientale e sanitario. Tuttavia il sistema legislativo dell'Unione europea non prevede una valutazione integrata degli effetti cumulativi delle sostanze chimiche: i pericoli e i rischi delle sostanze sono attualmente valutati considerando sostanza per sostanza. La sola analisi delle singole sostanze chimiche potrebbe non garantire una sufficiente sicurezza per quanto riguarda la tutela della salute umana e dell'ambiente. L'uomo e l'ambiente sono infatti esposti a quantità crescenti di sostanze chimiche provenienti da diverse fonti quali alimenti, medicinali, prodotti di consumo, scarichi industriali. Risulta quindi prioritario affrontare i potenziali effetti combinati delle sostanze chimiche in modo sistematico.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

Questo è stato chiaramente evidenziato dal 7° Programma Generale di Azione per l'ambiente dell'Unione Europea adottato dal Consiglio e dal Parlamento Europeo (Decisione 1386/2013/UE "Vivere bene entro i limiti del nostro pianeta") nel quale uno degli obiettivi era quello di sviluppare una strategia dell'Unione per un ambiente non tossico, anche attraverso azioni volte a mettere a punto approcci normativi adeguati per limitare gli effetti combinati delle sostanze chimiche. L'importanza della valutazione degli effetti combinati è stata ribadita anche dal Consiglio dei Ministri dell'ambiente europei nelle Conclusioni adottate il 26 giugno 2019 in cui la Commissione europea è stata invitata a presentare opzioni per introdurre nella normativa dell'UE requisiti specifici al fine di garantire che gli effetti combinati delle sostanze e l'esposizione combinata dell'uomo e dell'ambiente alle miscele di sostanze siano affrontati in modo adeguato e coerente. Alcuni progressi sono stati fatti: nell'ambito del Regolamento REACH è stata adottata nel 2018 (Regolamento UE 2018/2005) una restrizione degli ftalati DIBP, DBP BBP e DEHP in alcuni articoli che tiene in considerazione anche gli effetti combinati delle quattro sostanze. Tuttavia non vi è ancora un orientamento unico a livello europeo per la valutazione degli effetti combinati delle sostanze chimiche. Risulta, dunque, di primaria importanza la definizione di un approccio per la valutazione delle miscele, anche attraverso l'utilizzo di dati ambientali di contaminazione. A tale scopo a novembre 2018 è stato firmato un accordo di collaborazione tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e l'Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA) del CNR per l'individuazione di un approccio metodologico per valutare gli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche le miscele negli ecosistemi.

Introduzione alla valutazione degli effetti combinati delle miscele

Paola Grenni

Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR)

Ogni giorno l'ambiente (incluso l'uomo) è esposto a livelli residuali di centinaia di diverse sostanze chimiche di origine antropica presenti, ad esempio, nelle acque, nei prodotti che consumiamo ecc. La sola valutazione degli effetti delle singole sostanze chimiche potrebbe non garantire una sufficiente sicurezza dello stato di qualità dei diversi comparti ambientali e la tutela della salute umana, in considerazione che i singoli contaminanti possiedono in genere caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche estremamente differenti e gli effetti combinati delle sostanze possono portare ad effetti diversi, e talvolta più gravi, rispetto all'esposizione a singole sostanze chimiche. È necessario, pertanto, una valutazione complessiva dell'esposizione combinata a più sostanze chimiche. L'Unione Europea ha, tra i suoi obiettivi principali quello di sviluppare una strategia per un ambiente migliore attraverso azioni volte a sviluppare approcci adeguati per limitare gli effetti combinati delle sostanze, anche in relazione agli obiettivi di tutela ambientale e sanitaria stabiliti dal regolamento REACH (CE n.1907/2006).

Il Ministero dell'Ambiente e l'IRSA - C.N.R. stanno attualmente collaboran-

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

do per definire un approccio metodologico alla valutazione degli effetti combinati delle sostanze chimiche (valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze), anche in vista delle azioni che la Commissione europea avvierà nei prossimi mesi al fine di migliorare l'armonizzazione legislativa inerente le esposizioni combinate, intesa come un miglioramento della coerenza degli approcci, tra cui, ad esempio, la logica alla base della scelta di un particolare concetto di tossicità, l'uso di fattori di sicurezza, quando e come tenere conto delle interazioni, l'applicazione di approcci di modellazione basati sulle emissioni per determinare la co-presenza di sostanze chimiche nei comparti ambientali, ecc..

In questo ambito, è stato costituito un Gruppo di Lavoro a cui partecipano, oltre al Ministero, il CNR-IRSA, l'Università di Milano Bicocca, l'Istituto Superiore di Sanità (in particolare il Dipartimento Ambiente e Salute), l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (con il Centro Nazionale per la Rete dei Laboratori) nonché l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri.

Nella presentazione saranno sintetizzate le varie fasi del progetto. Inizialmente è stata effettuata un'accurata analisi dei principali e più attuali documenti realizzati dalle maggiori organizzazioni scientifiche internazionali (OECD, WHO, JRC, EFSA, SCHER ecc.) nonché pubblicazioni scientifiche internazionali sul problema delle miscele nell'ambiente; successivamente è stato sviluppato un approccio metodologico da utilizzare per la valutazione e gestione del rischio da miscele.

L'analisi della letteratura scientifica ha evidenziato che gli effetti tossici di una miscela possono essere predetti soltanto conoscendo non solo la completa composizione, ma anche le interazioni tra i componenti. Tali informazioni raramente possono essere note a priori, e vanno valutate caso per caso. È stato scelto per prevedere la tossicità di una miscela il modello di Löewe (*Concentration Addition* = Additività di Dose/Concentrazione), in quanto, in assenza di informazioni sulla tossicità della miscela, questo approccio risulta essere di caso peggiore (si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d'azione). In questo modello, inoltre, la tossicità della miscela viene calcolata ed espressa in termini di unità di tossicità (TU, *Toxic Unit*), ovvero sommando le concentrazioni misurate o previste di ciascun componente della miscela, normalizzate rispetto ad un *endpoint* ecotossicologico (ad es. per la potenza di tossicità di una miscela nei confronti dei pesci:

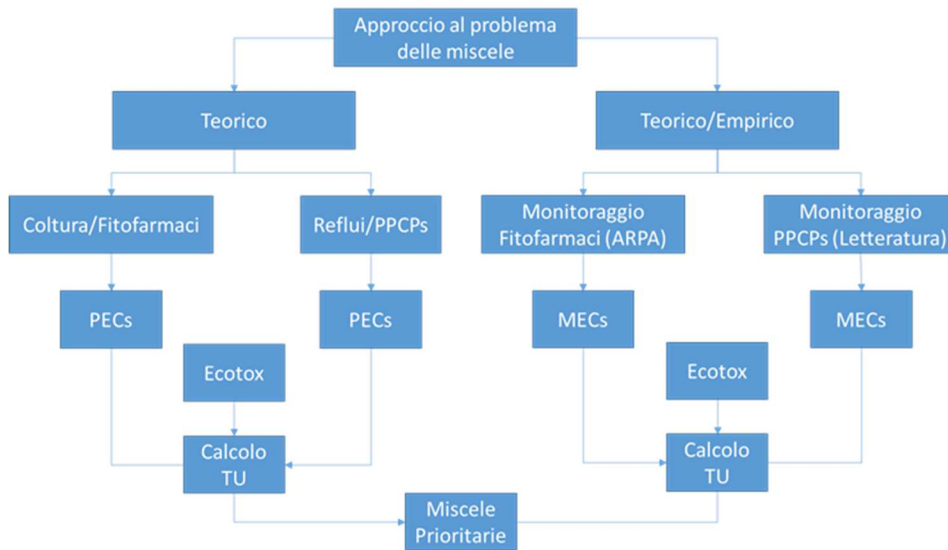
$$TU = \sum_i^n \text{Conc}_i / \text{LC50}_{i\text{pesci}}$$

dove: Conc_i è la concentrazione della i -esima sostanza componente la miscela e $\text{LC50}_{i\text{pesci}}$ la relativa concentrazione che provoca la morte del 50% dei pesci utilizzati nella prova dopo un certo periodo di tempo).

Su queste basi, nella fase successiva del progetto (definizione metodologica) questo modello è stato applicato a diversi casi di studio con concentrazioni dei contaminanti misurate (sia di quelli normati che di quelli emergenti), sia su concentrazioni previste (in scenari quali quelli agronomici o di un impianto di depurazione).

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop



Nella Figura è schematizzata la metodologia applicata. L'illustrazione dettagliata dei vari passaggi ed i relativi casi studio, nonché le criticità incontrate nella sua applicazione saranno oggetto di successive presentazioni. Qui si sottolinea brevemente che l'approccio può essere applicato sia in maniera prospettica (teorico previsionale) per prevedere la formazione di una miscela nell'ambiente, sia in maniera retrospettiva (empirica), utilizzando i dati di monitoraggio disponibili per la valutazione del rischio da miscela.

Le miscele nelle linee guida per la valutazione di impatto sanitario: aspetti tossicologici ed ecotossicologici

Mario Carere, Emanuela Testai

Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Salute

La Valutazione di Impatto Sanitario (VIS) è una procedura finalizzata a tutelare la salute delle popolazioni esposte agli impatti che piani/programmi/opere possono determinare sull'ambiente del territorio interessato. Il DL.vo 104/2017 ha recepito la Direttiva europea 2014/52/UE sulla Valutazione di Impatto Ambientale (VIA), prescrivendo per i nuovi impianti che rientrano in una specifica categoria (es. grandi impianti di combustione, raffinerie) di svolgere una VIS al fine di tutelare le popolazioni dai potenziali impatti che questi impianti determinano sul territorio. Nel 2019, su mandato del Ministero della Salute, ISS ha pubblicato le "linee guida per la valutazione di impatto sanitario" le cui fasi fondamentali sono: 1) *scoping*, 2) *assessment*, 3) *monitoring*, e 4) *reporting*. Poiché tali impianti possono comportare il rilascio e l'immissione negli ecosistemi di molteplici contaminanti la valutazione complessiva dell'impatto sanitario dell'opera può acquistare complessità nel caso frequente che essa comporti l'esposizione contemporanea della popolazione a più contaminanti. Per tali aspetti nelle linee guida VIS si tiene conto dei recenti approcci adottati da EFSA e Comitati Scientifici della DG Sante. Nel caso di esposizione multipla a più sostanze tossiche (non genotossiche) gli approcci valutativi possono essere diversificati in dipendenza delle conoscenze disponibili e del Meccanismo di azione delle sostanze. Generalmente si applica di default il criterio di "additività di dose" (stesso bersaglio, stesso MoA-Mode of Action) o di risposta (nel caso di MoA diversi); antagonismo

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

e sinergismo sono meno probabili ai livelli generalmente rilevati di concentrazioni ambientali. La VIS prevede anche una procedura ecotossicologica, da applicare nelle fasi di *scoping* e *monitoring*, tale applicazione tiene conto degli ultimi aggiornamenti scientifici a livello europeo, fornisce un elemento di garanzia ulteriore in particolare nella fase di «monitoring» dove l'utilizzo di saggi ecotossicologici negli ecosistemi rappresenta un utile sistema di allerta per prevenire effetti causati da miscele (complesse o con stesso MoA) sull'ambiente e indirettamente sulla salute umana.

Materiali di riferimento composti da miscele di sostanze emergenti a supporto dei metodi ecotossicologici (EBM) per la classificazione delle acque superficiali

Stefania Balzamo, Monica Potalivo

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Centro nazionale per la rete nazionale dei laboratori

Il destino delle sostanze chimiche nell'ambiente e la loro biodisponibilità influenza il rischio di contaminazione delle acque e il conseguente trasporto nella catena alimentare fino all'uomo. La valutazione della loro presenza è necessaria per definire lo stato chimico e quello ecologico delle acque; la Direttiva 2000/60/CE (WFD) elenca una lista di sostanze prioritarie di cui è stato definito uno Standard di Qualità Ambientale (SQA) che non deve essere superato per avere uno stato chimico buono dei corpi idrici ai sensi dell'art. 16, paragrafo 2 della Direttiva 2000/60/CE (WFD). Infatti i risultati di tali indagini concorrono alla classificazione dello stato chimico ed ecologico della risorsa idrica e quindi alla valutazione del grado di scostamento dagli obiettivi di qualità imposti dalle normative europee.

Inoltre, la direttiva 39/2013/UE, recepita in Italia con D.Lgs. 172/2015, prevede all'art.8, l'istituzione del monitoraggio di sostanze inserite nella lista di controllo (*watch list*). Tale elenco ha lo scopo di facilitare i futuri esercizi di definizione delle sostanze prioritarie e dei loro SQA per la classificazione dello stato chimico.

La presenza di un numero sempre maggiore di sostanze da monitorare e la conseguente presenza riscontrata nei corpi idrici richiede l'attenta e ragionata progettazione del monitoraggio, oltre alla sua corretta esecuzione. Inoltre, poiché la ricerca in ogni campione di quantità elevate di sostanze costituisce un impegno analitico gravoso, è necessario affrontare il problema da diverse angolazioni: i) l'utilizzo di Materiali di Riferimento Certificati sia per le singole sostanze che per le miscele e ii) l'uso di metodi ecotossicologici sensibili e speditivi per il monitoraggio di sostanze prioritarie nelle acque o loro miscele.

Nel presente lavoro vengono descritte alcune esperienze del Centro Nazionale per la rete nazionale dei laboratori dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) condotte negli ultimi anni insieme al Joint Research Centre (VA) e all'interno di un progetto europeo che vede la partecipazione degli Istituti Metrologici Nazionali (IMN) di Francia, Germania e Turchia.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

Quest'ultimo progetto JRP n 11 – EDC-WFD dal titolo “*Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive*”, finanziato dal programma EMPIR, è finalizzato alla validazione di metodi chimici e ecotossicologici per la determinazione di miscele di ormoni nelle acque e la produzione di Materiali di Riferimento Certificati per la determinazione in matrice di queste miscele e quindi garantire la riferibilità di queste misure.

Utilizzo di metodi *in silico* e *read-across* per la valutazione di miscele

Emilio Benfenati

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS - Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente

I modelli *in silico* e di *read-across* possono essere utili per valutare sia gli effetti tossici che l'esposizione dei contaminanti. Possono simulare dati mancanti per alcuni componenti della miscela, e fornire informazioni utili per raggruppare sostanze nella miscela. Le possibilità di raggruppamento possono servire per semplificare la gestione dei possibili effetti, accorpare sostanze che abbiano proprietà analoghe. Di particolare interesse è la possibilità di individuare per i diversi componenti il mode of action, e giungere quindi a un quadro migliore per la definizione di scenari secondo la modalità della *concentration addition*. È possibile effettuare raggruppamenti anche su altra base. I modelli *in silico* possono predire effetti della miscela attraverso modelli ad hoc, e il diverso comportamento ambientale dei componenti della miscela.

Valutazione del rischio da miscele di sostanze chimiche: proposta metodologica e casi studio

Antonio Finizio

Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Terra (DISAT), Università degli Studi di Milano Bicocca

La presenza di miscele complesse di composti chimici, documentata con sempre maggiore frequenza negli ambienti acquatici, ha determinato la necessità di maggiori conoscenze su questo argomento. Negli ultimi anni la ricerca, ha volto lo sguardo principalmente allo studio degli effetti di miscela sugli organismi acquatici. Tuttavia, un aspetto importante, ma ancora poco analizzato è la comprensione delle modalità con cui una miscela si origina nell'ambiente. Il futuro approfondimento di questa tematica è assolutamente fondamentale, nell'ottica di sviluppare strumenti previsionali nell'analisi e gestione del rischio da miscele per gli ecosistemi acquatici.

In questo contesto, nel presente studio, viene proposta una metodologia per prevedere ed identificare la composizione di miscele “prioritarie”. A tal proposito, sembra opportuno specificare che con il termine miscele prioritarie non si intende una miscela in cui, tra le componenti, siano presenti soltanto sostanze prioritarie (riportate nella Direttiva UE sulle sostanze prioritarie). Piuttosto, ci si riferisce a quelle combinazioni di sostanze che hanno un'elevata possibilità di originarsi come risultato delle emissioni di

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

rilevanti attività produttive.

L'approccio proposto è stato applicato a diversi casi studio ed in particolare:

- per la previsione di miscele di prodotti fitosanitari derivanti da una coltura agraria;
- per la previsione di miscele derivanti da impianti di depurazione (farmaci, prodotti per la cura del corpo etc.).

Indipendentemente dallo scenario (agricolo o impianti di depurazione) la metodica si basa sull'uso di modelli previsionali del destino ambientale, in grado di stimare le potenziali concentrazioni di una sostanza nell'ambiente (PEC: *Predicted Environmental Concentration*). Nel caso dei prodotti fitosanitari si propone l'uso dei modelli FOCUS, attualmente utilizzati nelle procedure di autorizzazione al commercio di queste sostanze. Nel caso, degli impianti di depurazione si suggerisce l'uso del modello proposto da EMA (*European Medicine Agency*) per i farmaci ad uso umano. Le PEC previste dai modelli sono successivamente rapportate a diversi *endpoint* ecotossicologici (es. PEC/LC50pesci) in modo da calcolare le frazioni di Unità di Tossicità (xTU) per ciascun componente della miscela. Infine, si procede alla sommatoria delle xTU ed all'applicazione di fattori di incertezza (se necessari), in modo da calcolare la tossicità della miscela secondo il modello di additività (*concentration addition*).

L'applicazione della metodologia proposta ai diversi casi studio ha permesso di valutare la sua applicabilità (inclusi i limiti) ed inoltre di osservare quanto segue:

Prodotti fitosanitari:

- alcuni scenari agricoli italiani risultano più a rischio a causa della formazione di miscele di prodotti fitosanitari. Infatti, gli scenari di runoff (scorrimento superficiale) sono più frequentemente interessati dal superamento della soglia di rischio rispetto agli scenari di drenaggio;
- la composizione delle miscele varia nel tempo sia nel numero che nel rapporto di concentrazioni tra i costituenti. Inoltre, la sua pericolosità varia in funzione degli organismi considerati (alga, dafnia, pesce);
- a seconda della coltura selezionata e della tipologia di prodotti utilizzati ci saranno dei periodi dell'anno in cui è più frequente il superamento delle soglie di rischio;
- In genere, solo una o poche sostanze determinano la tossicità della miscela. In moltissimi casi, ad esempio nel mais, i risultati hanno evidenziato che l'effetto atteso della miscela dipende esclusivamente da un insetticida organofosforico. Tuttavia, è da sottolineare che per queste sostanze la valutazione di rischio nelle procedure di registrazione a livello europeo ha coinvolto un *higher tier effect assessment* che ha identificato un uso sicuro. Questo approccio non è stato considerato in presente studio.

Impianti di depurazione:

- Il modello EMA utilizzato per il calcolo delle PEC, non ha una sufficiente risoluzione temporale. Infatti, contrariamente ai modelli FOCUS che restituiscono delle PEC su base giornaliera, in questo caso si ottiene

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

un unico valore di concentrazione prevista;

- Inoltre, per la sua applicazione sono necessarie una serie di informazioni non sempre di facile reperimento (es. quantitativi di farmaci utilizzati in una determinata area). Questo, ovviamente, aumenta il grado di incertezza sui risultati ottenuti;
- Malgrado questi limiti (che possono essere superabili aumentando il grado di conoscenza dell'area oggetto di studio), l'applicazione della metodologia ha confermato quanto già emerso per i prodotti fitosanitari. Ovvero, esiste una variabilità temporale nella composizione qualitativa delle miscele derivanti da impianti di trattamento delle acque ed in genere la pericolosità delle miscele dipende da una o pochissime sostanze.

In conclusione, l'approccio metodologico proposto permette di identificare le miscele prioritarie (combinazioni di sostanze con elevata probabilità di ritrovarsi contemporaneamente in un corpo idrico) derivanti da una o più colture agrarie o da impianti di depurazione. Questo è importante, dal punto di vista applicativo, in quanto fornisce degli spunti di ricerca per valutare gli effetti di miscela sperimentalmente (es. come assemblare una miscela da testare in laboratorio). Inoltre, l'indicazione che una o pochissime sostanze contribuiscono in maniera rilevante alla tossicità di miscela offre una prospettiva differente dal punto di vista della gestione del rischio da miscela. Infatti, mettendo in atto delle azioni volte a ridurre le concentrazioni in acqua di queste sostanze si abbassa notevolmente anche il rischio della miscela.

Una procedura per la gestione dati e il calcolo del rischio da miscele di sostanze chimiche

Andrea Di Guardo

Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Terra (DISAT) - Università degli Studi di Milano Bicocca

L'approccio teorico/empirico proposto dal gruppo di lavoro si basa sull'analisi di dati di monitoraggio di sostanze chimiche normate ed emergenti. I dati possono derivare da fonti di letteratura scientifica, in particolare nel caso dei contaminanti emergenti, e da campagne di monitoraggio effettuate dalle ARPA nell'ambito della Direttiva 2000/60/CE ("Water Framework Directive").

La metodologia propone di calcolare la tossicità della miscela esprimendola in termini di unità di tossicità (TU, *Toxic Unit*), identificata come la sommatoria dei rapporti tra la concentrazione misurata della singola sostanza per il corrispondente *endpoint* tossicologico; inoltre, il calcolo è riferito ad un singolo momento e un singolo luogo di campionamento (caratterizzazione spazio-temporale). È importante sottolineare questi aspetti perché la mole di dati da gestire può incrementare notevolmente a seconda sia dell'ampiezza del territorio da analizzare che del numero di anni considerati.

Al fine di agevolare l'applicazione dell'approccio teorico/empirico anche in contesti territorialmente e temporalmente ampi, il gruppo di lavoro ha implementato una procedura semi-automatica di gestione dei dati e di

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

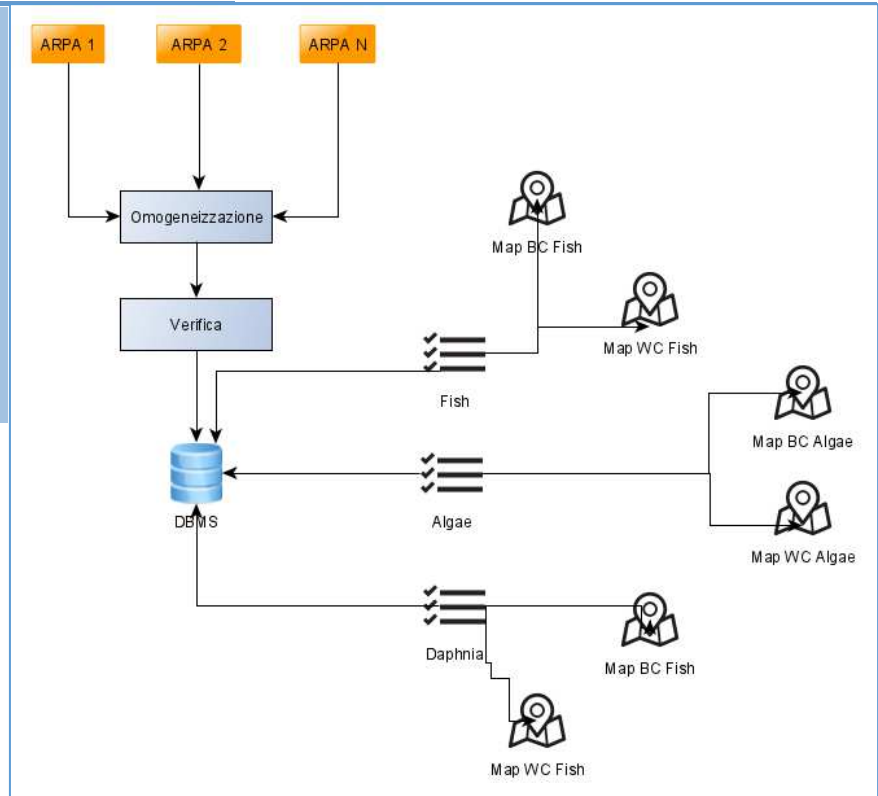


Figura 1. Schema concettuale delle operazioni

calcolo dei valori di TU che prevede l'utilizzo di sistemi informatici di media complessità: SQL server come base dati relazionale (anche nella versione gratuita Express Edition), Microsoft® Excel e Microsoft® Access. In Figura 1 è riportato il flusso di lavoro. Stabilita l'area di interesse, si procede con l'acquisizione dei dati dalle ARPA interessate. L'insieme delle informazioni deve passare attraverso un processo di verifica e omogeneizzazione spaziale (nel caso di dati acquisiti da diverse ARPA) e temporale (in caso di variazioni di formato).

In questa fase è necessario inoltre elaborare le informazioni relative alla concentrazione misurata quando il valore riscontrato è inferiore al Limite di Quantificazione (LoQ, *Limit of Quantification*). Seguendo la metodologia proposta, tutte le misure inferiori a LoQ devono essere sostituite con il valore $[LoQ/2]$, utilizzato poi in fase di calcolo nel cosiddetto "Worst case". I dati elaborati vengono poi inseriti in una base dati relazionale utilizzando un semplice modello dati (Figura 2) che contempla una tabella dei dati di monitoraggio complessivi e una tabella degli endpoint tossicologici. La prima ("Dati stazioni" nella Figura 2) deve includere obbligatoriamente le

informazioni relative a:

- identificativo stazione;
- coordinate geografiche stazione;
- data di campionamento;
- sostanza campionata;
- valore misurato o $[LoQ/2]$ (in una unità di misura).

Altre informazioni di contorno (comune dove si trova la stazione, bacino idrografico, asta o corso idrico) possono essere utili per una facile lettura dei dati, ma non sono necessari ai successivi calcoli

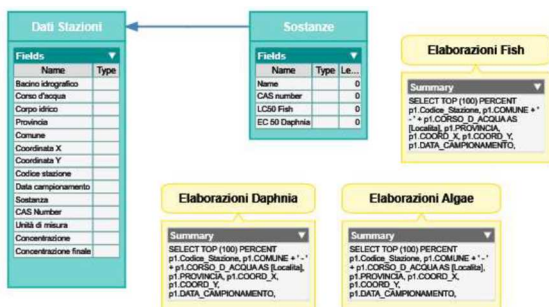


Figura 2. Modello dati

La tabella degli endpoint tossicologici ("Sostanze" nello schema di Figura 2) contiene i dati degli endpoint tossicologici per le sostanze di interesse. I dati possono essere acquisiti da basi dati esterne come ad esempio il *Pesticide Properties DataBase* (Lewis et al., 2016) o da fonti di letteratura scientifica. La base dati contiene poi una serie di viste (in giallo nel modello dati della Figura 2) che estraggono le informazioni dalle due tabelle principali e effettuano i calcoli previsti dalla metodologia sviluppata. Una vista è relativa ad un particolare organismo target.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

In particolare, sono estratti o calcolati i seguenti campi:

- l'identificativo della stazione;
- le coordinate geografiche della stazione;
- la data di campionamento;
- la TU calcolata nel "best case", escludendo quindi le sostanze i cui valori sono al di sotto del LoQ;
- il numero di sostanze considerate nel calcolo della TU "best case";
- l'elenco delle sostanze considerate nel calcolo della TU "best case";
- l'elenco delle sostanze che pur avendo valori sopra LoQ non è stato possibile considerare per assenza di endpoint tossicologici associati;
- la TU calcolata nel "worst case", includendo quindi le sostanze i cui valori sono al di sotto del LoQ e considerando come valore $[LoQ/2]$;
- il numero di sostanze considerate nel calcolo della TU "worst case";
- l'elenco delle sostanze considerate nel calcolo della TU "worst case".

I dati estratti attraverso ogni vista possono poi essere agevolmente esportati in un foglio di calcolo per ulteriori elaborazioni e per costituire la base dati di partenza per la visualizzazione cartografica.

Applicazione territoriale dell'approccio metodologico di valutazione del rischio da miscele di sostanze chimiche: elaborazioni cartografiche

Anna Bruna Petrangeli

Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR)

L'obiettivo del lavoro svolto congiuntamente da IRSA e Univ. Bicocca di Milano, in cui si inserisce la presente attività, consiste nella presentazione di una metodologia per la valutazione del rischio da miscele di sostanze chimiche che consenta di rilevarne la presenza ed identificarne la composizione in ambiente acquatico e l'impatto di tali miscele sugli organismi. In questo ambito si colloca il presente studio, che ha l'obiettivo di testare la metodologia proposta su cinque casi di studio distribuiti sul territorio nazionale mediante un approccio di tipo territoriale sviluppato in ambiente GIS; la finalità è la produzione di carte tematiche che rappresentino la presenza di miscele ricorrenti, la potenza delle miscele nei vari scenari e l'influenza della singola sostanza sulla potenza della miscela.

La cartografia e la gestione dei dati sono stati realizzati utilizzando il software ArcGIS della ESRI. La metodologia sviluppata per la produzione cartografica si è articolata in tre fasi distinte successivamente integrate tra loro: la definizione del contesto geografico di riferimento, l'elaborazione dei dati analitici e la produzione di cartografia tematica in ambiente GIS.

La prima fase ha riguardato la preparazione di mappe di base omogenee per la caratterizzazione geografica dei casi di studio, per ognuno dei quali si è provveduto a georeferenziare le stazioni di misura e altri elementi ritenuti utili (impianti di trattamento, ecc). I dati sono stati archiviati in Geodatabase dedicati, uno per ogni caso di studio. Il sistema di riferimen-

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

to utilizzato è WGS84 UTM 32N.

La seconda fase è stata oggetto di un'altra attività del team di lavoro (IRSA e Univ. Bicocca di Milano) e condotta utilizzando database relazionali; come output sono state prodotte tabelle in formato Excel contenenti dati sulle frazioni di tossicità (che rappresentano il rapporto tra la concentrazione della i-esima sostanza componente la miscela e l'endpoint tossicologico di ciascun livello trofico considerato), espresse in percentuale e tabelle di unità di tossicità (somma delle frazioni di tossicità della concentrazioni misurate di ciascun componente della miscela). La frazione di tossicità e l'unità di tossicità sono state calcolate per ogni caso di studio e per ogni campagna, considerando scenari di Best Case (nella valutazione della miscela sono state considerate solo le sostanze con una concentrazione misurata maggiore del LOQ) e Worst Case (nella valutazione della miscela sono state considerate tutte le sostanze; dove la concentrazione fosse minore del LOQ, il valore di concentrazione attribuito alla sostanza è pari a $LOQ/2$). Inoltre per l'unità di tossicità è stato anche applicato un *Assessment Factor* pari a TU/0.01 per i livelli trofici di pesce e dafnia e TU/0.1 per alga.

Nella terza fase tali tabelle, importate nei Geodatabase e messe in relazione (join) con i dati geografici, hanno fornito la base per la produzione cartografica. Le mappe sono state realizzate utilizzando template il più possibile omogenei per i vari casi di studio; sono state inoltre elaborate due diverse tipologie di legenda (archivate in lyr file) rappresentative di tutti i casi di studio relative sia alla potenza della miscela sia all'influenza espressa in percentuale di ogni sostanza nella composizione della miscela.

Il contributo della cartografia nello studio delle miscele è identificabile nella percezione immediata della distribuzione dei dati, nella possibilità di analizzare la potenza delle miscele nello spazio e nel tempo in relazione ai vari scenari (posizione delle stazioni rispetto a riferimenti di importanza strategica, ad esempio prima/ dopo impianto di depurazione ecc) e di avere la percezione del contributo di ogni sostanza alla tossicità delle miscele. Inoltre i dati analitici possono essere messi in relazione con altri layer informativi ritenuti utili per lo scenario in esame. Dal punto di vista tecnico, anche per future implementazioni, è importante sottolineare la facilità di interazione tra software diversi e la potenzialità di automatizzazione delle procedure di analisi dei dati e creazione di mappe per una rapida ricognizione della situazione in atto (ad esempio con cadenze temporali bene definite) tramite script o plugin dedicati (utilizzando linguaggi di scripting, tipo Python ecc).

Metodi innovativi di analitica per le miscele

Sara Valsecchi, Stefano Polesello

Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR)

L'analisi di miscele di contaminanti organici costituisce una sfida analitica che da tempo coinvolge i laboratori che si occupano del monitoraggio di matrici ambientali. Non esiste un'unica strategia globale per l'identificazione di tutte le sostanze inquinanti che sono presenti nell'ambiente. Co-

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

unque, l'odierno sviluppo delle tecniche per l'analisi chimica di molecole organiche o dei test in vitro per la misura degli effetti biologici dei composti chimici consentono la caratterizzazione di miscele specifiche di contaminanti ambientali che condividono caratteristiche chimiche, meccanismi di tossicità o sorgenti comuni di contaminazione.

Nella presentazione saranno passati in rassegna metodi chimici e biologici, specifici e aspecifici di recente sviluppo impiegati per l'analisi di miscele complesse ambientali come quelle che possono essere presenti negli effluenti di depurazione, nei sedimenti o nel biota che vive in ambienti contaminanti. Le tecniche cromatografiche accoppiate alla rivelazione di massa ad altissima risoluzione sono i metodi d'analisi d'eccellenza per l'identificazione dei componenti di miscele complesse ambientali perché permettono la determinazione accurata di un numero elevato di composti insieme all'identificazione di contaminanti inattesi e/o a composti di trasformazione che si possono generare nei processi biotici e abiotici ambientali.

Tuttavia a volte non è necessario il preciso riconoscimento dei componenti della miscela ma è sufficiente o preferibile uno screening della presenza di una miscela di inquinanti nell'ambiente. È per questo motivo che anche metodi di analisi chimica aspecifici per il riconoscimento di classi di sostanze chimiche o test in vitro per la misura dell'effetto tossico integrato sono al momento in considerazione per l'implementazione nei monitoraggi ambientali.

I vantaggi e gli svantaggi di ogni tecnica analitica verranno confrontati e casi studio specifici saranno illustrati per comprendere potenzialità e limiti dei diversi approcci proposti.

Miscele di sostanze chimiche nell'ambiente: stato dell'arte della valutazione del rischio

Emanuela Pace

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Sezione sostanze pericolose

Oltre 100.000 sostanze chimiche sono presenti sul mercato europeo, queste, nelle varie fasi del proprio ciclo di vita, dalla produzione all'uso, alla dismissione, possono potenzialmente essere rilasciate nell'ambiente. Pertanto l'uomo e gli ecosistemi sono generalmente esposti a miscele di sostanze attraverso per esempio: acqua, cibo, prodotti di consumo. Per ridurre eventuali impatti negativi dovuti alla presenza di miscele nell'ambiente è necessario eseguire una valutazione di rischio che comprenda gli aspetti di pericolo e di esposizione a queste sostanze.

Dal punto di vista della valutazione tossicologica la modalità più diffusa, sinora, si basa sull'additività degli effetti delle singole sostanze in relazione alla loro concentrazione. Pertanto, anche sostanze presenti in concentrazioni non rilevanti possono contribuire alla tossicità complessiva. Il modello è raccomandato dalla Commissione Europea, anche quando si ignorano le modalità d'azione dei componenti della miscela. Vari approcci metodologici, quali: modelli in vitro, in silico, di tossicocinetica, intervengono nel colmare le lacune conoscitive sulle sostanze.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

La determinazione sperimentale della tossicità della miscela, d'altro canto, può essere effettuata nel caso di composizioni non note. Tuttavia la procedura è poco praticabile in considerazione delle molteplici combinazioni possibili delle sostanze in miscela.

La valutazione dell'esposizione deve tenere conto di molteplici informazioni, tra cui: le fonti, le vie di esposizione, la durata, la frequenza, la variabilità nel tempo. Oltre ai modelli di esposizione, i dati di monitoraggio rappresentano un valido contributo alla conoscenza degli impatti reali sull'ambiente e alla determinazione dei possibili trend. Il loro uso è raccomandato dal Parlamento Europeo al fine di una valutazione retrospettiva del rischio da poliesposizione.

Ad oggi la normativa europea non prevede una valutazione completa e integrata degli effetti cumulativi di una miscela. La valutazione del rischio si basa essenzialmente sulle singole sostanze e le singole fonti. In alcuni casi, normative settoriali prevedono la valutazione di miscele di composizione nota, come ad esempio per l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari, dei biocidi, dei farmaci e altre normative ancora. Tuttavia, le stesse normative non coprono l'esposizione combinata di sostanze chimiche disciplinate da altre norme settoriali.

Un pratico approccio proposto dalle Agenzie per le sostanze chimiche svedese e olandese consiste di adottare un ulteriore fattore di sicurezza nella valutazione di rischio delle sostanze, il MAF - *Mixture Assessment Factor*. In tal modo si terrebbe in considerazione il fatto che ogni sostanza immessa nell'ambiente può contribuire all'esposizione combinata dell'uomo e dell'ambiente.

Gli effetti combinati sulla salute umana: approccio valutativo attuale

Raffaella Cresti, Leonello Attias

Istituto Superiore di Sanità (ISS), Centro Nazionale Sostanze Chimiche, prodotti Cosmetici e protezione del Consumatore

L'uomo e l'ambiente sono esposti ad una molteplicità di sostanze chimiche che rendono gli attuali approcci normativi, basati quasi esclusivamente sulla valutazione della singola sostanza, non pienamente rappresentativi del reale rischio associato all'esposizione.

Negli anni è cresciuta la preoccupazione rispetto ai potenziali effetti avversi dovuti alle interazioni tra le sostanze presenti all'interno delle miscele e la mancanza di una metodologia condivisa rappresenta uno degli aspetti su cui la comunità scientifica sta ponendo grande attenzione, al fine di garantire la tutela della salute umana e la salvaguardia dell'ambiente.

Le Istituzioni Europee a diversi livelli (i.e., Consiglio dei Ministri dell'Ambiente, Parlamento e Commissione Europea) si sono impegnate ad avviare un processo con l'obiettivo di sviluppare un adeguato approccio alla valutazione dei rischi associati all'utilizzo di miscele chimiche.

In tale contesto, tre comitati scientifici indipendenti coinvolti nella valutazione del rischio associato ai *chemicals* (SCHER - Il comitato scientifico per i rischi sanitari e ambientali; SCCS - Comitato scientifico per la sicurezza dei consumatori; SCHENIR - Il comitato scientifico che si occupa valu-

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

tazione dei nuovi e futuri rischi per la salute) hanno elaborato un'esaustiva linea guida che raccoglie i principi e i metodi da adottare nella valutazione delle miscele.

In ambito più strettamente regolatorio, il Regolamento (UE) n. 1907/2006 (Regolamento REACH) ed il Regolamento (UE) n. 528/2012 (Regolamento Biocidi) hanno definito una loro strategia nell'affrontare il problema della valutazione dei rischi combinati.

Il Regolamento REACH non obbliga esplicitamente il produttore della miscela a valutare il rischio combinato delle singole sostanze presenti all'interno della miscela. Tuttavia, possono esserci situazioni in cui il formulatore deve tenere conto dell'additività degli effetti delle sostanze presenti nella miscela, al fine di elaborare una comunicazione adeguata per il controllo dell'esposizione riportato nella SDS della miscela.

Diversamente, il Regolamento Biocidi prescrive che, per autorizzare un prodotto biocida per ciascuno dei principi attivi e per qualsiasi sostanza che desti preoccupazione, debba essere effettuata una valutazione del rischio combinato. Il Regolamento definisce il concetto di "sostanza che desta preoccupazione" e i criteri per la sua identificazione. Oltre ai criteri individuati dal Regolamento Biocidi, la linea guida per la valutazione dei rischi dei biocidi identifica ulteriori cinque criteri addizionali per l'identificazione di una "sostanza che desta preoccupazione" e indica la metodologia da applicare per la definizione quali-/quantitativa dei rischi associati all'uso del prodotto biocida.

A Food and feed Safety Perspective for harmonised risk assessment of combined exposure to multiple chemicals in the human health, animal health and ecological areas

Jean Lou C.M Dorne

European Food Safety Authority, Scientific Committee and Emerging Risks Unit, Parma, Italy

In 2019, the European Food Safety Authority (EFSA) has developed a guidance document on harmonised methodologies for the human health (HRA), animal health (ARA) and ecological risk assessment (ERA) of combined exposure to multiple chemicals ("chemical mixtures") for the food and feed safety areas. Its application can however be broadened to other regulatory areas and across regulatory silos. Key challenges to such harmonisation include the large number of chemicals involved, variations in associated exposure patterns, toxicological profiles in humans and species of veterinary and ecological relevance as well as the diversity of regulations and associated RA frameworks. First, the harmonised framework proposed for HRA, ARA and ERA relies on principles of tiering and stepwise approaches for problem formulation, exposure assessment, hazard assessment, risk characterisation and uncertainty analysis. The application of tiering principles ranges from qualitative, semi-quantitative to fully probabilistic approaches and is of flexible nature depending on the purpose of the RA, availability of data, time and resources.

The problem formulation phase sets out the purpose of the RA, methodo-

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

logical approaches to be used and the analysis plan to provide a decision point to apply either a whole mixture (WMA) or a component-based approach (CBA) in the RA. For the WMA, the mixture is most often assessed using the same approaches as for a single compound. For the CBA, the default model for assessing combined toxicity is the dose addition model. In some situations, evidence for deviation from the dose addition assumption needs to be assessed using a weight of evidence (WoE) approach particularly for interactions leading to synergistic effects. The result of such a WoE analysis allows either the (semi-)quantification of the magnitude of the interaction through applying an extra uncertainty factor or a biologically-based model (e.g. toxicokinetic–toxicodynamic model) in the hazard and risk characterisation steps. It is worth noting that for a given RA, once the outcomes of the assessment have been determined, important caveats for interpretation need to be considered.

For transparency of the RA process, a reporting template has been designed and illustrated for the HRA, ARA and ERA areas. Finally, future perspectives for mixture RA are discussed and examples are highlighted particularly Open source toxicological databases (OpenFoodTox) and mechanistic alternatives to animal testing (i.e. in silico and in vitro biologically-based models). These will provide: (1) scientific tools directed towards the RA and regulatory community, (2) means to apply harmonised methodologies and (3) vehicles to train the current and next generation of risk assessors.

Discussione e prospettive future

Anna Barra Caracciolo

Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR

Durante il progetto svolto con il Ministero, al fine di confrontarsi su come affrontare la tematica delle miscele nell'ambiente, è stato costituito a livello italiano un Gruppo di Lavoro⁽¹⁾ composto da esperti nel campo della valutazione del rischio degli effetti combinati di sostanze chimiche. I componenti appartengono alle più prestigiose università italiane, Istituti di ricerca ed enti pubblici. Di seguito i nominativi indicati e gli Enti di appartenenza

- Anna Barra Caracciolo, Istituto di Ricerca Sulle Acque-CNR
- Paola Grenni, Istituto di Ricerca Sulle Acque-CNR
- Antonio Finizio, Università Bicocca di Milano
- Emilio Benfenati, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente
- Mario Carere, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Dipartimento Ambiente e Salute
- Stefania Balzamo, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Am-

⁽¹⁾ *Approvazione del MATTM 30 Aprile 2019 al MATTM - Prot. m_amte. DVA. REGISTRO UFFICIA-LE.U.0013777.30-05-2019*

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

bientale (ISPRA), Centro Nazionale per la Rete dei Laboratori

- Monica Potalivo, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Centro Nazionale per la Rete dei Laboratori
- Serena Santoro, Istituto Sull'inquinamento Atmosferico-CNR presso il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Il Gruppo di lavoro si è riunito e confrontato diverse volte nel corso della durata dell'Accordo, su quanto proposto ad oggi dalla comunità scientifica. Per la valutazione delle miscele di sostanze chimiche, è stato condiviso il modello di additività dose/concentrazione. In particolare è stato ritenuto che tale modello è quello generalmente riconosciuto a livello europeo nella valutazione teorica relativa agli effetti delle miscele.

Infatti, sebbene ad oggi, i dati ecotossicologici e tossicologici relativi agli effetti delle miscele siano limitati (basti pensare ai pochi dati sui contaminanti emergenti o le infinite possibili combinazioni degli effetti di diverse sostanze), il modello di additività dose/concentrazione o Concentration addition (CA) è quello ritenuto più idoneo in assenza di adeguate informazioni relative all'effetto ecotossicologico dell'intera miscela e delle possibili interazioni (sinergiche, antagoniste ecc.) tra due o più dei suoi componenti. Il modello CA è generalmente riconosciuto nella valutazione del rischio ambientale come l'approccio di caso peggiore perché si assume che tutte le sostanze presentino lo stesso meccanismo d'azione (non esistendo informazioni dettagliate di ecotossicità su tutte le sostanze inquinanti esistenti).

Il modello CA (basato sulla sommatoria delle Unità di Tossicità) si è dimostrato efficace nella sua applicazione a diversi casi di studio considerando tre livelli trofici rappresentativi del comparto acquatico, utilizzando dati ambientali di contaminazione misurati, e dati previsti. Si vuole sottolineare che l'approccio può essere applicato sia in maniera prospettica (teorico previsionale) per prevedere la formazione di una miscela nell'ambiente, sia in maniera retrospettiva (empirica), utilizzando i dati di monitoraggio disponibili per la valutazione del rischio da miscela.

I risultati dello studio hanno permesso di individuare le miscele prioritarie (intese come combinazioni di sostanze che hanno un'elevata possibilità di formazione nell'ambiente e che rappresentano un pericolo reale per gli ecosistemi). Tali miscele sono quelle su cui sarebbe necessario approfondire le conoscenze (es. test ecotossicologici o analisi sulla matrice ambientale). Si evince, inoltre, quali siano le sostanze che hanno un maggior contributo nella tossicità di una miscela. Tale aspetto è fondamentale al fine di una gestione del rischio delle miscele, potendo intervenire sulle sostanze che realmente governano la potenza della tossicità, permettendo di potere valutare quali misure di prevenzione/mitigazione del rischio per limitarne la contaminazione in uno specifico contesto ambientale. Dallo studio si evince che solo una o pochissime sostanze contribuiscono in maniera rilevante alla tossicità di miscela. Questa indicazione offre una prospettiva differente dal punto di vista della gestione del rischio da miscela. Infatti, mettendo in atto delle azioni volte a ridurre le concentrazioni ambientali di queste sostanze si abbasserebbe notevolmente anche il rischio della miscela.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI COMBINATI DELLE MISCELE DI SOSTANZE CHIMICHE

Digital workshop

Ovviamente sarebbero auspicabili, a valle di ogni screening, ulteriori approfondimenti, soprattutto per quelle miscele che mostrano una potenza di tossicità >1 .

Il Digital Workshop svoltosi oggi ha avuto una grande partecipazione di oltre 180 iscritti appartenenti a Amministrazioni Pubbliche, Enti di ricerca, Università, Associazioni di categoria e imprese. È stata non solo l'occasione per presentare i risultati dello studio affidato dal Ministero dell'Ambiente all'RSA-CNR ma ha soprattutto costituito l'occasione per un confronto e aggiornamento sulla materia.



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News

**Pubblicazione quadrimestrale telematica dell'Istituto di Ricerca sulle Acque
del Consiglio Nazionale delle Ricerche**

ISSN 2465-017X

Autorizzazione Tribunale di Tivoli n°5/2015

Direzione e Redazione

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, S.P. 35d, km 0,700
C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)
e-mail: redazione.notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Giuseppe Mascolo

Direttore Scientifico

Stefano Polesello

Comitato di Redazione

L. Campanella, A.M. De Girolamo, P. Grenni, L. Guzzella, S. Polesello, L. Patrolecco,
S. Valsecchi

Segreteria di Redazione

S. Ghergo

<http://www.irsa.cnr.it/Notiziario>

