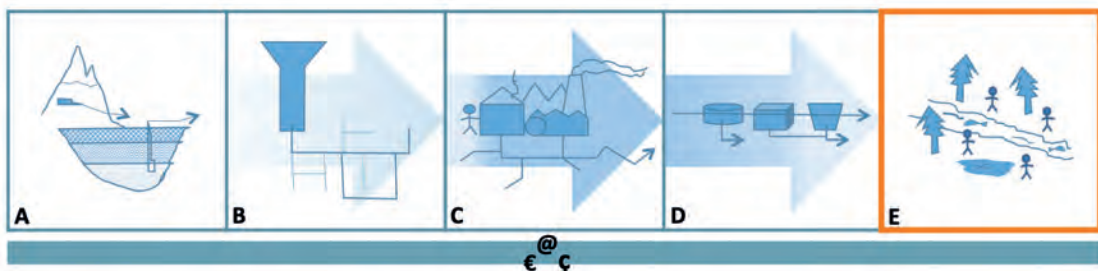


QUADERNI AUSIR E-4

mappe di tossicità: sviluppo di una nuova strategia per la valutazione (eco)tossicologica che integra metodi tradizionali e *in silico*

a cura di
Giuseppa Raitano
Emilio Benfenati



Stampa

Impressum, Marina di Carrara (Ms)

© **FORUM** 2023

Editrice Universitaria Udinese

FARE srl con unico socio

Società soggetta a direzione e coordinamento

dell'Università degli Studi di Udine

Via Palladio, 8 – 33100 Udine

Tel. 0432 26001

www.forumeditrice.it

ISBN 978-88-3283-425-3

QUADERNI AUSIR E-4

**mappe di tossicità: sviluppo di una
nuova strategia per la valutazione
(eco)tossicologica che integra metodi
tradizionali e *in silico***

a cura di
Giuseppa Raitano
Emilio Benfenati

INDICE

Prefazione	p.	7
1. Introduzione	»	9
1.1. Background regolatorio	»	9
1.2. Metodi <i>in silico</i> in breve	»	11
1.3. Indice ERICA	»	13
2. Sviluppo del metodo in sette steps	»	17
2.1. Siti di campionamento	»	18
2.2. Caratterizzazione e identificazione CECs	»	19
2.3. Valutazione del pericolo	»	21
2.3.1. <i>Caratterizzazione del pericolo, valutazione eco-tossicologica</i>	»	23
2.3.2. <i>Caratterizzazione del pericolo, valutazione tossicologica</i>	»	25
3. Analisi del rischio	»	29
3.1. Analisi del rischio ecologico	»	30
3.2. Analisi del rischio per la salute umana: rischio tossicologico non cancerogeno	»	31
3.3. Analisi del rischio per la salute umana: rischio tossicologico cancerogeno	»	35
4. Metodo di <i>scoring</i> e indice integrato di rischio	»	37
4.1. <i>Scoring</i> interno	»	37
4.2. Indice integrato di rischio IRW: metodo	»	39
5. Risultati	»	43
5.1. Caratterizzazione e identificazione CECs	»	43
5.2. Valutazione del pericolo	»	46
5.2.1. <i>Dati disponibili di tossicità umana: valori sperimentali e predetti relativi ai contaminanti trovati</i>	»	46
5.3. Analisi del rischio	»	47

Indice

<i>5.3.1. Analisi del rischio ecologico</i>	»	47
<i>5.3.2. Analisi del rischio per la salute umana</i>	»	49
5.4. Indice integrato di rischio: IRW	»	50
6. Conclusioni	»	55
Bibliografia e sitografia	»	57
Pubblicazioni relative al progetto UNIUD-AUSIR	»	67

PREFAZIONE

Scopo del presente lavoro è stato quello di fornire uno schema generale di valutazione delle proprietà (eco)tossicologiche e ambientali consentendo una nuova integrazione tra la gestione delle risorse idriche e la conservazione dell'ambiente e della salute umana nell'ambito di cicli idrici coerenti e integrati. Il progetto che si andrà a descrivere è stato pensato per sfruttare le caratteristiche tossicologiche di un fiume con modesti impatti ambientali, il fiume Ledra (Udine, Italia), al fine di trovare un solido metodo di valutazione dell'inquinamento residuo.

L'uso dei metodi *in silico* a integrazione e sostegno di quelli tradizionali ha permesso di elaborare una strategia globale (per la salute umana e quella ambientale) di valutazione del rischio basata su un singolo indice di tossicità che combina la presenza di più contaminanti con comportamento ambientale diverso, proprietà (eco)tossicologiche e varie concentrazioni. L'indice di rischio (eco)tossicologico integrato (*integrated Index of toxicological Risk related to the Water quality*, IRW) descrive lo stato generale di salute del fiume Ledra 'fotografato' in mappe cromatiche. Tale approccio, una volta ottimizzato su questo fiume, può essere quindi applicato ad altri corpi idrici. Questo studio 'pilota' si colloca all'interno di un progetto più ampio, *Studio dell'impatto di xenobiotici del ciclo integrato dell'acqua, per assicurare una gestione sostenibile ottimale degli ecosistemi territoriali*, e ha visto la collaborazione tra il Gruppo di Inquinamento e Depurazione dell'Ambiente dell'Università di Udine, l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano e l'ARPA FVG.

Per meglio delineare il lavoro svolto, il presente report si organizzerà in tre principali sessioni: la prima introdurrà i presupposti, regolatori e metodologici, su cui si è basato il progetto; la seconda riporterà i risultati ottenuti facendo riferimento a tutte le aree di ricerca analizzate, e la terza darà spazio a una discussione sulle possibili applicazioni/implicazioni.

1. INTRODUZIONE

Lo studio qui riportato parte dalla necessità di valutare l'impatto delle sostanze sull'ambiente e sulla popolazione, in un modo articolato e prospettico, al fine di individuare e prioritizzare le potenziali criticità che potrebbero emergere per la presenza di inquinanti nei corpi idrici.

Le fasi dello studio sono le seguenti:

- esame dell'impostazione regolatoria;
- impostazione della struttura concettuale della valutazione e individuazione degli elementi necessari;
- caratterizzazione e quantificazione dei contaminanti presenti;
- recupero dei dati sperimentali di tossicità ed eco-tossicità dei contaminanti;
- predizione dei dati con modelli computazionali, nel caso di dati sperimentali mancanti;
- integrazione delle informazioni sulle concentrazioni e gli effetti dei contaminanti per la valutazione del rischio ambientale e tossicologico;
- definizione e utilizzo di un indice integrato al fine di stabilire quali siano i contaminanti più critici.

1.1. Background regolatorio

La direttiva 2013/39/UE (Direttiva, 2013), che costituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, conferma i principi generali di precauzione e prevenzione prevista dalla precedente Direttiva emanata nel 2000 (Direttiva, 2000). Inoltre, stabilisce la necessità di ampliare l'elenco delle sostanze prioritarie aggiungendo quei contaminanti che hanno dato adito a nuove preoccupazioni ambientali, a causa del loro crescente e incontrollato uso. L'articolo 8 ter, paragrafo 1, della direttiva 2008/105/CE (Direttiva, 2008) aveva già previsto la stesura di un elenco di sostanze o gruppi di sostanze per i quali dovevano essere raccolti dati

di monitoraggio a livello europeo allo scopo di sostenere futuri esercizi di definizione delle priorità. La Commissione Europea ha reso disponibile questo elenco nella decisione di esecuzione (UE) 2015/495 del 20 marzo 2015 (Decisione di esecuzione (UE) della Commissione, 2015). Tra le sostanze elencate nell'espansione sono presenti: estrogeni (ad esempio, 17-alfa-Etinilestradiolo (EE2), 17-beta-Estradiolo (E2), estrone (e 1)), antinfiammatori non-steroidali (ad esempio, Diclofenac), antibiotici macrolidi (ad esempio, Eritromicina e Claritromicina) e insetticidi (ad esempio, Imidacloprid).

Le acque reflue legate all'urbanizzazione, all'industria e all'agricoltura alterano la composizione delle risorse naturali, introducendo contaminanti con effetti nocivi sull'ecosistema e anche sulla salute umana.

Gli impianti di trattamento delle acque reflue (*Waste Water Treatment Plants*, WWTP) sono ampiamente utilizzati per la loro conversione in un effluente che può essere restituito al ciclo dell'acqua con un minimo impatto inquinante. Al fine di evitare l'inquinamento ambientale causato da contaminanti di 'emergente' preoccupazione (*Contaminants of Emerging Concern*, CEC), i WWTP devono essere costantemente monitorati e aggiornati.

I CEC, come prodotti farmaceutici, prodotti per la cura personale, interferenti endocrini (*Endocrine Disrupting Compounds*, EDC) come gli estrogeni e gli androgeni, ma anche come gli IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici) dello scarico auto e del fumo sigaretta, le diossine nella combustione delle plastiche e il bisfenolo A, sono stati rilevati nelle acque reflue ma poco si sa dei loro effetti eco-tossicologici (Ribeiro et al., 2015; Cleuvers, 2003; Bendz et al., 2005; Kim et al., 2012; Isidori et al., 2005; Pawlowski et al., 2004; Ferrari et al., 2003; Zhang et al., 2008; Winter et al., 2008; Watts et al., nd; Segura et al., 2009; Chang et al., 2011; Bellet et al., 2011). L'attuale mancanza di conoscenza riguarda in particolare gli effetti cronici, raramente indagati (Winter et al., 2008; Fent et al., 2006). In effetti, la maggior parte dei WWTP urbani convenzionali non è specificamente progettata per rimuovere le concentrazioni residue di composti organici (Ribeiro et al., 2015) come i CEC. Abbiamo quindi bisogno di conoscenze molto più dettagliate su questi inquinanti e sui loro effetti per pianificare interventi mirati e migliorare le prestazioni degli strumenti odierni. Proprio per supplire a questa mancanza, il progetto si è avvalso dei metodi *in silico*.

1.2. Metodi *in silico* in breve

I modelli da noi usati, i cosiddetti *Quantitative Structure-Activity Relationships* (QSAR) si rifanno alle tecniche *in silico*, espressione che si richiama al silicio come componente del computer, e ai metodi *in vivo*, ovvero su animale, e *in vitro*, ad esempio con l'impiego di cellule.

L'ipotesi alla base dei QSAR risiede nella possibilità di conoscere in un qualche modo l'attività di un composto partendo dalla semplice struttura chimica. Si sa che, in effetti, certe proprietà chimico-fisiche, quali il punto di fusione, per esempio, sono da mettersi in relazione con la struttura chimica. Anche certi tipi di tossicità sono predetti con modelli QSAR.

L'Environmental Protection Agency (US EPA) americana utilizza da decenni alcuni modelli QSAR per predire un certo numero di proprietà chimico-fisico, ambientali e tossicologiche.

Attualmente esistono diversi modelli, sia gratuiti che commerciali, che predicono le proprietà chimico-fisiche dei composti chimici organici con buone approssimazioni. Ad esempio, ci sono modelli che predicono la temperatura di ebollizione, il punto di fusione, i tempi di ritenzione gas cromatografici, etc. Anche altre proprietà di interesse ambientali sono predette con modelli di tale tipo. Tali modelli sono in molti casi basati su alcuni parametri semplici, quali il coefficiente di ripartizione ottano/acqua.

La tossicità è un fenomeno più complesso della maggior parte dei parametri chimico-fisici. Questo rende più arduo il compito della predizione delle proprietà (eco)tossicologiche.

Il possibile utilizzo di tali modelli in ambito regolatorio ha rinnovato anche in Europa l'interesse per i metodi QSAR.

Negli ultimi anni si è acceso l'interesse di individuare se e fino a che punto i metodi QSAR possano essere utilizzati per scopi predittivi di effetti tossici. Infatti, sempre più numerosi sono stati i contaminanti ambientali individuati, anche per effetto delle enormi capacità analitiche degli strumenti moderni. La maggior parte di tali contaminanti non presenta dati tossicologici adeguati, e molto spesso tali dati sono del tutto carenti.

Inoltre, legislazioni quali il *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (REACH, EC Regulation No 1907/2006) richiedono di valutare numeri molto alti di composti chimici industriali, alcune decine di migliaia, e tale situazione comporta un uso molto elevato di animali da esperimento, costi molto alti e tempi molto lunghi.

Come conseguenza di queste impellenti esigenze, ricercatori e regolatori si stanno ponendo sempre più il quesito di come utilizzare metodi ‘non convenzionali’ quali i QSAR per supplire a tale mancanza di informazioni. Le componenti principali di un modello QSAR sono tre: la parte biologica, quella chimica e quella matematica. L’informazione biologica è quella che deriva dai dati sperimentali degli esperimenti tossicologici. Un modello QSAR è essenzialmente un modello che estrae della conoscenza utilizzando una serie di dati sperimentali. Ogni modello QSAR deve quindi basarsi su una serie di dati di natura sperimentale che vengono usati per costruire il modello. Tali dati costituiscono le fondamenta del modello. Tanto più numerosi sono i dati, tanto più estesa sarà la base di conoscenza da estrarre e quindi più robusto il modello. Inoltre, è molto importante che la qualità dei dati sperimentali sia buona: *garbage in, garbage out* è il tipico detto in questo come in altri casi di modelli, ovvero se la qualità dei dati in ingresso è scarsa, non si può pretendere che i risultati finali siano buoni.

La seconda componente del modello QSAR è quella chimica. L’assunto alla base dei modelli QSAR è che l’effetto osservato sia dovuto alla particolare molecola esaminata e che tramite l’osservazione della struttura, o di qualche particolare caratteristica della struttura, sia possibile stabilire l’effetto. Occorre però individuare la modalità più opportuna di descrivere tale informazione.

Infine, la terza componente è quella matematica, che è la componente che cerca di mettere in relazione il dato biologico/tossicologico con quello chimico.

In pratica, i modelli QSAR partono da una serie di dati di tossicità per un certo numero di composti chimici. Si calcolano poi dei parametri chimici che si ritiene utili per descrivere le molecole allo studio. Infine, tramite modelli matematici opportuni si cerca di individuare un rapporto specifico fra una o più delle variabili chimiche e la tossicità.

Nel caso specifico nostro, molti dei modelli QSAR usati sono quelli della piattaforma VEGA (<https://www.vegahub.eu/>). Per usare VEGA l’utente deve semplicemente inserire il composto chimico d’interesse, usando la struttura *Simplified Molecular-Input Line-Entry System* (SMILES). Questo formato è fra i più usati. Esistono diverse modalità di scrittura SMILES, ma VEGA trasforma il formato SMILES usato dall’utente in un formato omogeneo per VEGA, in modo da ottenere risultati più riproducibili e controllati. Fra l’altro, questo è un chiaro vantaggio rispetto ad altri model-

li statunitensi dove i risultati ottenuti cambiano a seconda del formato usato dall'utente per introdurre la molecola d'interesse.

Oltre a poter inserire un composto per volta è possibile inserire una serie di composti, a mano, su righe successive, ovvero come file. Questa modalità è conveniente nel caso di valutazione di raccolte di composti. VEGA è stato testato su quattro milioni di composti, dimostrando una forte robustezza.

È possibile ottenere la predizione di una proprietà alla volta, ma anche di una serie di proprietà, selezionate dall'utente, simultaneamente. Inoltre, per alcune proprietà è possibile ottenere predizioni ottenute usando modelli diversi per la stessa proprietà. Questa opportunità rafforza l'attendibilità del risultato complessivo, nel caso di concordanza fra i diversi metodi. Nel caso di discordanza si deve valutare l'attendibilità del singolo metodo. È proprio qui risiede un elemento di forza di spicco per VEGA.

L'utente ottiene, come output, naturalmente la predizione per la molecola d'interesse, ma in più VEGA offre una stima dell'affidabilità della predizione specificatamente per la sostanza d'interesse. Questa valutazione è condotta attraverso un software del tutto diverso e indipendente dal modello QSAR. In altre parole, in VEGA convivono per ogni modello due programmi; uno che produce la predizione e uno che valuta se la predizione è affidabile.

Quindi, parleremo ora non solo dei modelli, ma della loro valutazione.

Il concetto del campo di applicazione (spesso denominato *Applicability Domain*, ovvero AD in sigla) è abbastanza recente, più recente rispetto ai metodi QSAR. Esso si riallaccia alla necessità di stabilire in che misura un dato modello può essere applicato per una sostanza specifica. È evidente quindi che il contesto si ricollega all'uso per scopi ad esempio regolatori, di applicazione pratica a un determinato caso. La valutazione dell'AD è infatti segnatamente richiesta dalla legislazione REACH, nell'allegato XI.

1.3. Indice ERICA

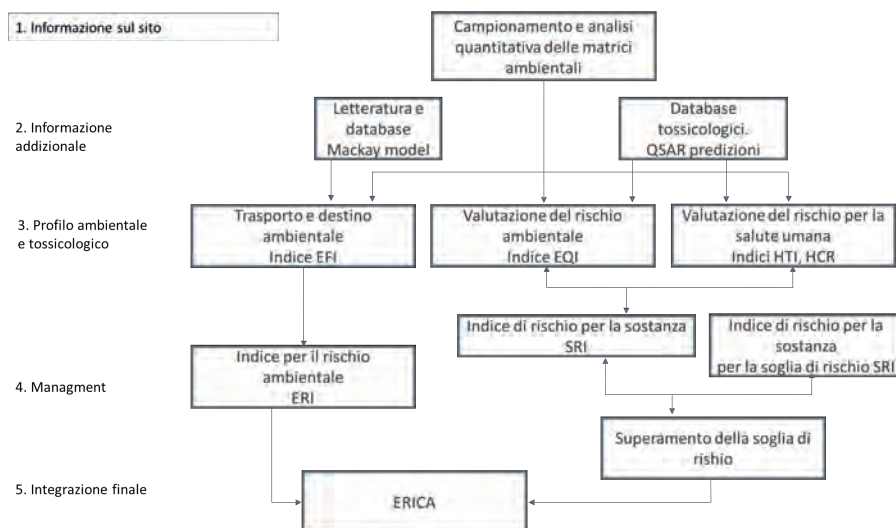
Come anticipato nell'introduzione, il progetto che si sta descrivendo si prefigge di fornire uno schema per la valutazione complessiva di proprietà (eco)tossicologiche e ambientali dei corpi idrici mirando a una nuova combinazione di gestione delle risorse idriche e conservazione dell'ambiente e della salute nell'ambito di una coerente integrazione ci-

cli dell'acqua. La valutazione si basa su un unico indice (eco)tossicologico, combinando il rilevamento di più contaminanti caratterizzati da diversi comportamenti ambientali, proprietà (eco)tossicologiche e concentrazioni.

Sono stati pubblicati molti indicatori di rischio, sistemi di priorità e schemi che esaminano le sostanze chimiche e i loro potenziali effetti negativi una volta rilasciate nell'ambiente. Tuttavia, al momento questi indici globali non sono in grado di produrre un unico valore che rispecchi il rischio potenziale dei composti sulla salute umana e ambientale, su scala locale, per ogni comparto ecologico (acqua, suolo, sedimenti e aria).

I numerosi fattori coinvolti ne rappresentano la complessità della domanda. Per questo lavoro abbiamo applicato una versione aggiornata dell'indice *Environmental Risk Index for Chemicals Assessment* (ERICA). Nella versione originale, ERICA è una strategia integrata che combina diversi contributi all'impatto di una miscela di contaminanti e si basa su diversi indici di valutazione del rischio (Boriani et al., 2010; 2013).

Fig. 1.1. Schema concettuale/metodologico dell'indice ERICA.



ERICA risulta dall'applicazione di questi indici indipendenti che vengono accorpati. ERICA, infatti, integra in un unico valore la valutazione del rischio eco-tossicologico, la valutazione del rischio per la salute umana e il destino ambientale e dei trasporti utilizzando un sistema di punteggio specifico. Questo sistema a punteggio si basa sulle caratteristiche degli inquinanti quali le diverse proprietà fisico-chimiche, la potenziale classificazione in Persistente, Bioaccumulabile e Tossico (PBT) e i loro profili tossicologici. Tutte queste informazioni, unite all'incertezza dovuta a dati mancanti o incerti e al superamento del rischio, concorrono alla definizione del valore unico.

L'indice (eco)tossicologico traduce in tossicità il flusso di massa emesso da una sorgente ed è integrato con un indice di rischio ambientale allo scopo di valutare lo stato generale della salute ambientale di un territorio, riflettendo l'impatto degli inquinanti sui diversi comparti ambientali (suolo, acqua, sedimenti e aria). L'indice ERICA si fonda sull'analisi del rischio per i recettori ecologici e umani, come illustrato nelle linee guida internazionali (European Communities, 2003; Government of Canada, s.d.). In questo studio abbiamo ottimizzato e applicato l'indice ERICA concentrandoci sugli indici di rischio tossicologico ed ecologico, ipotizzando un destino ambientale degli inquinanti statico, solo nel comparto idrico. L'ottimizzazione della strategia ha coinvolto lo sviluppo e l'utilizzo di metodi robusti *in silico*, da applicare in mancanza di dati sperimentali. Sono stati utilizzati diversi modelli QSAR, gratuitamente disponibili, specifici per la valutazione ecologica e umana, e ne sono stati sviluppati di nuovi, *ad hoc* per il progetto.

L'uso dei metodi *in silico*, tra l'altro favorito in molti contesti regolatori (European Community, s.d.; <https://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/3290>; Benigni et al., 2019; Mombelli e Ringeissen, 2009; Fjodorova et al., 2008; https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf/e4a2a18f-a2bd-4a04-ac6d-0ea425b2567f; https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r6_en.pdf/77f49f81-b76d-40ab-8513-4f3a533b6ac9; OECD, 2014) ha avuto il merito di colmare le lacune nella raccolta dei dati sperimentali, attraverso un approccio veloce e conveniente anche in termini monetari.

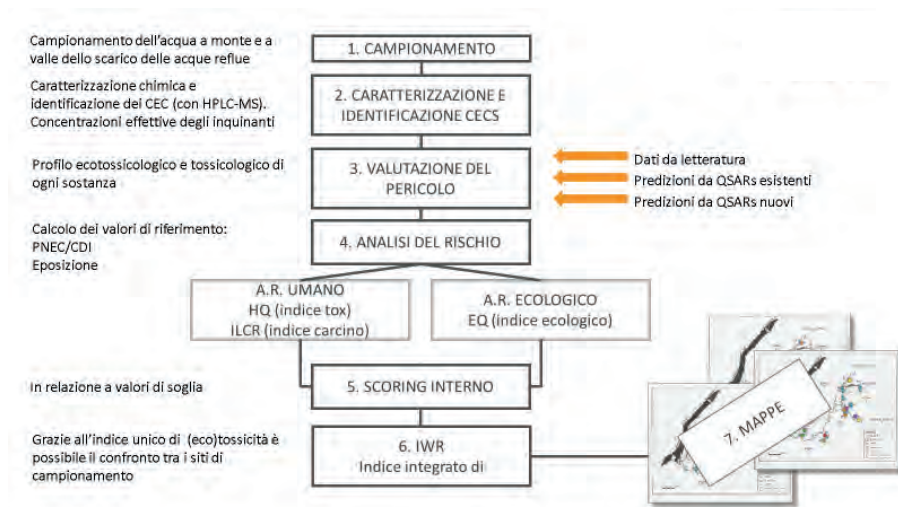
Nella presente versione, l'indice integrato del rischio tossicologico relativo alla qualità delle acque (IRW), ottenuto dalla nuova strategia globale di valutazione del rischio, è in grado di descrivere lo stato di salute generale dell'area studiata del fiume Ledra, rappresentato dalle mappe cromatiche (eco)tossicologiche.

2. SVILUPPO DEL METODO IN SETTE STEPS

L'approccio proposto per l'analisi del rischio tossicologico integrato delle acque del sito indagato comprende sette fasi (Fig. 2.1):

- campionamenti d'acqua;
- caratterizzazione chimica degli inquinanti e identificazione dei CEC;
- valutazione del pericolo dei CEC utilizzando dati di letteratura e valori predetti da modelli *in silico* esistenti e nuovi;
- valutazione del rischio umano ed ecologico;
- applicazione del metodo di *scoring* interno;
- valutazione del rischio globale (calcolo IRW);
- mappe (eco)tossicologiche.

Fig. 2.1. *Articolazione del metodo in sette steps.*



6	Fiume Ledra	In corrispondenza del troppo pieno dell'impianto di depurazione di Gemona del Friuli	Gemona del Friuli
7	Rio Artegna	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di Artegna	Artegna
8	Rio Artegna	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Artegna	Artegna
9	Rio Vedelis	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di Madonna di Buia	Madonna di Buia, Buja
10	Rio Vedelis	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Madonna di Buia	Madonna di Buia, Buja
11	Torrente Orvenco	Dopo lo scarico degli impianti di depurazione di Borgo Curminie-Montenars	Artegna
12	Rio Avilla	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di Avilla	Avilla, Buja
13	Rio Avilla	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Avilla	Avilla, Buja
14	Prima Lago	A monte dello sbarramento	Gemona del Friuli
15	Dopo Lago	A valle dello sbarramento	Gemona del Friuli

Ci sono numerosi WWTP in quest'area. La maggior parte di essi sono stati realizzati durante la ricostruzione della regione Friuli Venezia Giulia a seguito del terremoto del 1976.

2.2. Caratterizzazione e identificazione CECs

Nei campioni di acqua, più di 130 CEC sono stati monitorati mediante analisi di cromatografia liquida-spettrometria di massa ad alte prestazioni (HPLC-MS). Le analisi sono stati svolte presso il laboratorio di spettrometria di massa dell'Istituto Mario Negri e da ARPA FVG. Sono stati utilizzati due metodi validati per l'analisi dei farmaci (Riva et al., 2015; Castiglioni et al., 2005) e delle droghe illecite (Castiglioni et al., 2006) dal personale dell'unità di strumentazione analitica del Mario Negri. Per entrambe le analisi è stato utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API3000 (Applied Biosystems - Sciex, Thornhill, Ont., Canada) interfacciato a un sistema HPLC serie 200 (Perkin Elmer). Un al-

tro metodo convalidato è stato utilizzato per la quantificazione degli ormoni e composti fitosanitari (<https://ec.europa.eu/jrc/en/news/firstwatch-elenco-inquinanti-acque-emergenti>). Il metodo sviluppato da ARPA FVG è stato utilizzato per l'analisi di pesticidi e composti fitosanitari aggiuntivi. Per queste analisi è stato utilizzato uno spettrometro di massa Sciex Q-Trap 6500 (Ramingham, MA, USA), interfacciato con un sistema HPLC Shimadzu Nexera2.

Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna A C18 CoreShell (100×2.1 mm, 2.7 µm, Supelco Ascentis Express) con due fasi mobili: formiato/acido formico 0.0033 M (pH 3.7) tampone (MP-A) e acetonitrile (MP-B). Il gradiente di eluizione è stato il seguente: dal 25% al 50% di MP-B in 2 min; al 95% di MP-B in 3.2 min, mantieni al 95% per 0.2 min e riequilibrio per 2.8 min al 25% di MP-B. Tutte le analisi sono state eseguite con la tecnica *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), misurando i prodotti di frammentazione di protonato o ioni pseudo-molecolari protonati di ciascun analita.

Fig. 2.3. Siti di campionamento sul fiume Ledra.

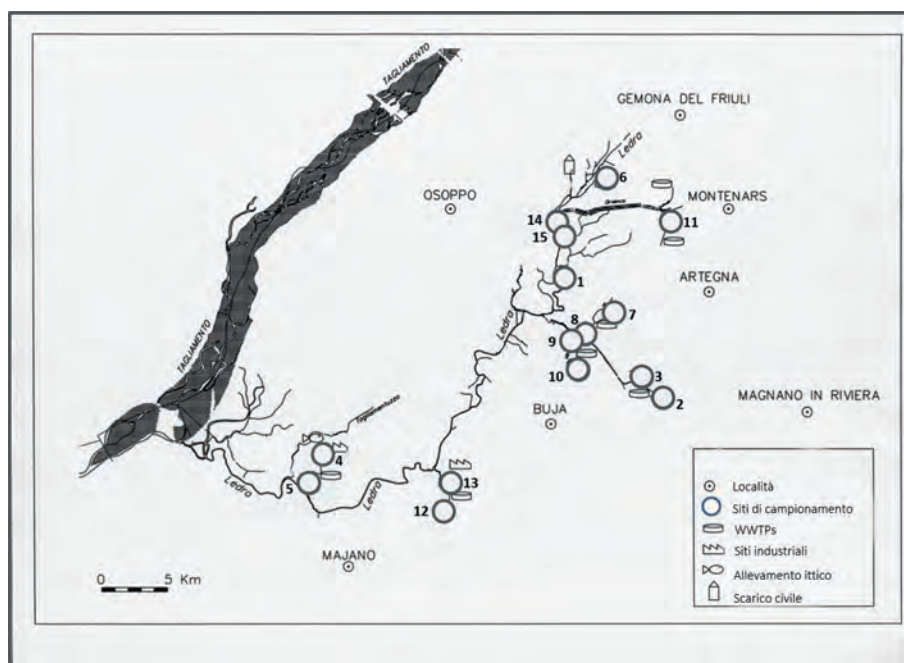


Fig. 2.4. Laboratorio di spettrometria di massa presso l'Istituto Mario Negri.



Tra i contaminanti ricercati nei campioni di acqua prelevati nell'area di studio, sono stati inseriti anche alcuni composti presenti nell'espansione della lista delle sostanze prioritarie da monitorare del 2015 (vedi paragrafo 1.1), come ad esempio: 17-alfa-Etinilestradiolo; 17-beta-Estradiolo; Diclofenac; Imidacloprid.

2.3. Valutazione del pericolo

Facendo riferimento alla procedura descritta nelle linee guide europee (Commission Directive 93/67/EEC; Council Regulation (EEC) 793/93; TGD - Technical Guidance Document on Risk Assessment, 2003; Commission Regulation (EC) No. 1488/94), la valutazione del rischio tossicologico di una sostanza si può suddividere in quattro fasi:

- identificazione del pericolo, ovvero quale tipo di effetti avversi può indurre la sostanza;

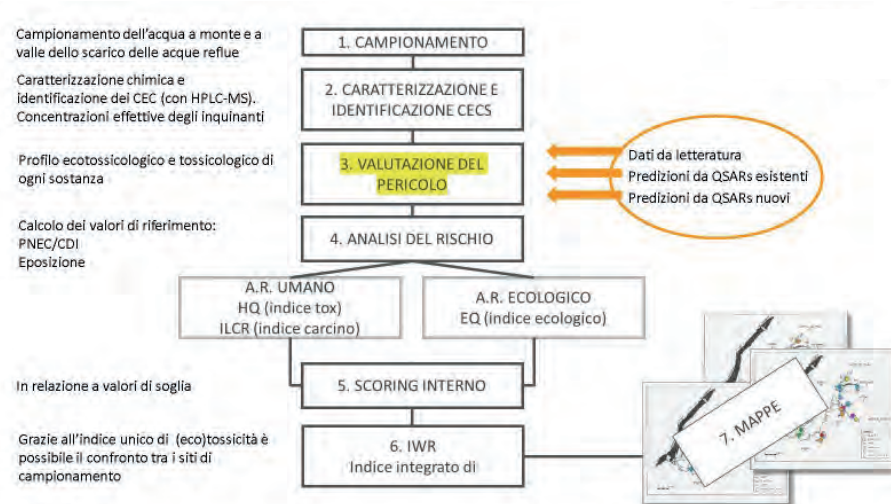
- caratterizzazione del pericolo, che tiene conto dell'esposizione quando non si osserva un determinato effetto avverso;
- valutazione dell'esposizione umana;
- caratterizzazione del rischio, ovvero quali e come sono gli effetti sulla popolazione esposta.

Un altro presupposto molto importante da chiarire è la differenza tra pericolo e rischio. Il pericolo è una caratteristica intrinseca della sostanza mentre il rischio è la probabilità che la sostanza possa provocare effetti avversi dipendentemente dalla dose a cui si viene esposti (dose soglia).

Quindi, il pericolo di una sostanza identifica la potenziale tossicità della sostanza stessa e può essere identificato (misurato) attraverso la raccolta e la valutazione di diversi studi (eco)tossicologici che possono includere sperimentazioni (*in vitro* o *in vivo*) o predizioni di modelli *in silico*.

Nel nostro caso, per la valutazione del pericolo di ogni sostanza quantificata, sono stati cercati e usati dati sperimentali trovati in letteratura, predizioni fatte con modelli QSAR già disponibili e, ove necessario, predizioni fatte con modelli QSAR sviluppati *ad hoc* per il progetto. In questo modo, è stato possibile stilare il profilo eco-tossicologico e tossicologico di ogni sostanza.

Fig. 2.5. *Valutazione del pericolo nel metodo generale in sette steps. Sono evidenziati gli strumenti utilizzati per l'esecuzione della stessa.*



2.3.1. *Caratterizzazione del pericolo, valutazione eco-tossicologica.* Per la caratterizzazione eco-tossicologica degli inquinanti quantificati, sono stati collezionati dati per i tre livelli trofici (algae, *Daphnia Magna* e pesce) sia di tossicità acuta che cronica. I dati sperimentali sono stati cercati e selezionati dalle seguenti piattaforme/fonti, gratuitamente disponibili:

- ECOTOX database (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>);
- QSAR Toolbox platform (<https://www.qsartoolbox.org/>);
- *Pesticide Properties Data Bases* (PPDB) (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/310.htm>);
- articoli da letteratura (Kim et al., 2012; <https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/our-company/Sustainability/Atenolol.pdf>; Czech et al., 2014; Fenet et al., 2012; Kim et al., 2007).

I dati sperimentali sono stati selezionati sulla base della loro conformità alle linee guida ufficiali dell'Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (OECD, 1992; 2004; 2011; 2012; 2013). Nel caso di dati multipli, è stato scelto il valore più basso, secondo un approccio conservativo.

I modelli QSAR riportati nella Tabella 2.2 sono stati utilizzati per i composti per i quali non sono stati trovati dati sperimentali adeguati in letteratura. Ove possibile, per ogni composto abbiamo esaminato le predizioni di tutti i modelli, considerando sia la loro concordanza nella risposta che la loro affidabilità. L'affidabilità di ogni predizione è stata valutata in base all'appartenenza o meno al dominio di applicabilità (*Applicability Domain*, AD) dei modelli, seguendo i cinque principi OECD della validazione dei metodi QSAR (OECD, 2014).

Tutti i modelli VEGA (<http://www.vega-qsar.eu/>) forniscono un indice AD come misura dell'affidabilità di ogni predizione; il valore di questo indice può variare da 0 (caso peggiore) a 1 (caso migliore) ed è calcolato sulla base di altri sottoindici.

Le predizioni dei modelli VEGA per la tossicità acuta sia per *Daphnia Magna* che per pesce sono state ottimizzate in due metodi di consenso (Cassano et al., 2014). Il metodo di consenso considera nella propria risposta il valore predetto di ogni modello individuale e il valore di AD ad esso associato, quindi sia la predizione che la sua affidabilità.

Tab. 2.2. *Modelli usati per le predizioni delle proprietà eco-tossicologiche, gli endpoints investigati e le piattaforme in cui i modelli sono disponibili.*

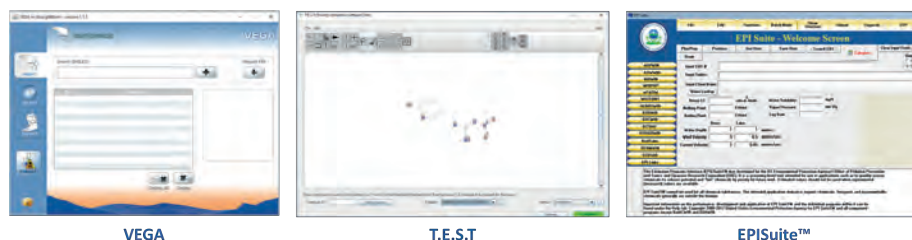
Endpoints	Piattaforma	Modelli
Algae, <i>Daphnia magna</i> e pesce, tossicità acuta e cronica	EPI Suite™ (<i>Estimation Program Interface</i>)	ECOSAR v.1.11
Pesce, tossicità acuta (LC50 96h)	TEST (<i>Toxicity Estimation Software Tool</i>)	Consensus method
	VEGA (<i>Virtual models for property Evaluation of chemicals within a Global Architecture</i>)	Fish acute (LC50) toxicity model (k-NN/read-across) v.1.0.0
		Fathead minnow LC50 96h (EPA) v.1.0.7
<i>Daphnia magna</i> , tossicità acuta (EC50 48h)	TEST (<i>Toxicity Estimation Software Tool</i>)	<i>Daphnia magna</i> 48h (EPA) v 1.0.7
		<i>Daphnia magna</i> 48h (Demetra) v. 1.0.4
	TEST (<i>Toxicity Estimation Software Tool</i>)	Consensus method

A parità di affidabilità, abbiamo selezionato la predizione con il valore più basso, secondo il principio di precauzione. Le predizioni QSAR sono state particolarmente preziose nel caso di farmaci e droghe per i quali i dati eco-tossicologici sono scarsi. La piattaforma TEST dell'EPA (<https://www.epa.gov/chemicalresearch/tossicità-stima-software-strumento-test>) non fornisce un valore specifico per l'AD ma fornisce la predizione solo se la sostanza appartiene all'AD dei modelli. I modelli EPISuite™ non forniscono automaticamente un valore di AD per ogni predizione, ma ne abbiamo valutato l'affidabilità in base alla conformità delle predizioni con diversi parametri elencati nelle guide ai modelli (<https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface>).

I valori così raccolti, dati sperimentali e predizioni QSAR, sono stati usati per il calcolo dei valori soglia di riferimento di ogni sostanza, e cioè le concentrazioni di non effetto o *Predicted No-Effect Concentration* (PNEC). Queste concentrazioni sono state messe a confronto con quelle effettivamente trovate nei campioni di acqua e conseguentemente si è stati in grado di delineare il rischio eco-tossicologico di ogni analita.

2.3.2. *Caratterizzazione del pericolo, valutazione tossicologica.* Così come è stato fatto per la parte eco, anche per la valutazione del rischio tossicologico si è partiti dalla raccolta e dalla valutazione dei dati disponibili in letteratura. Per ogni analita identificato, valori sperimentali di riferimento per la tossicità non cancerogena quali la dose giornaliera ammissibile (*Acceptable Daily Intake*, ADI) e la dose di riferimento (*chronic oral Reference Dose*, RfD) (US EPA, 1993) e quelli di *Slope Factor* (SF) per la tossicità cancerogena sono stati cercati in diverse fonti disponibili.

Fig. 2.6. *Modelli qsar esistenti: piattaforme.*



Database, linee guida sulla valutazione del rischio umano (Watts et al., s.d.; Australian Guidelines for Water Recycling, 2008; Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Drinking Water, 2008) e articoli da letteratura (Snyder et al., 2008; Ho et al., 2013) sono stati interrogati al fine di raccogliere più dati possibili e di qualità.

Le fonti principali sono state:

- il database IRIS (Sistema Informativo Integrato sui Rischi) (<https://www.epa.gov/iris>) dell'EPA;
- il database RAIS (Risk Assessment Information System, https://rais.ornl.gov/cgi-bin/tools/TOX_search?select=chem);
- la banca dati ISS-INAIL (Istituto Superiore di Sanità e Istituto Nazionale per la Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro) <http://www.iss.it/iasa/index.php?lang=1&tipo=40>.

Inoltre, ancora più che per la parte eco-tossicologica, i modelli QSAR hanno giocato un ruolo fondamentale nell'analisi del rischio umano andando a sopperire una mancanza più marcata di dati sperimentali. Mentre per la valutazione eco-tossicologica sono stati usati modelli QSAR già esistenti, per quella tossicologica è stato necessario sviluppare modelli *ad*

hoc per la predizione dei valori di RfD e SF, rispettivamente per la tossicità non cancerogena e cancerogena. Per entrambe le proprietà, le predizioni dei nuovi modelli sono state selezionate sulla base di metodi specifici. La Figura 2.7 semplifica graficamente il metodo utilizzato per acquisire valori affidabili di SF.

Per ogni composto, sono state verificate/messe a confronto le predizioni del nuovo modello di SF con quelle risultanti dal metodo consenso già citato (Cassano et al., 2014). Questo metodo è stato usato per integrare le predizioni di quattro modelli di cancerogenicità già implementati nella piattaforma VEGA e mostrati nella Tabella 2.3.

Tab. 2.3. *Modelli QSAR in classificazione, per la valutazione del potenziale cancerogeno delle sostanze. I modelli appartengono tutti alla piattaforma VEGA.*

Nome del modello	Metodo su cui si basa il modello	Riferimenti
CAESAR	Rete neurale artificiale di contropropagazione (CP ANN)	a ¹
ISS	Regole esperte come implementato nel software ToxTree versione 2.6	b ²
IRFMN/Antares	Regole estratte automaticamente con il software SARpy	c ³
IRFMN/ISSCAN-CGX	Regole estratte automaticamente con il software SARpy	d ⁴

Tutti e quattro i modelli classificatori di VEGA hanno predetto la potenziale cancerogenicità di ogni sostanza quantificata. Se l'integrazione delle quattro predizioni avesse classificato il composto come cancerogeno allora, e solo in quel caso, si sarebbe associato il valore di SF risultante dalla predizione del nuovo modello.

Tutti i modelli VEGA danno, infatti, una predizione qualitativa della cancerogenicità (classificazione binaria: cancerogeno/non cancerogeno) partendo da diversi set di dati sperimentali e basati su diversi metodi, come è descritto nella Tabella 2.3.

¹ Fjodorova et al., 2010.

² <http://toxtree.sourceforge.net>; Benigni et al., 2007; Benigni et al., 2008; Benigni et al., 2013).

³ <http://sarpy.sourceforge.net/index.php>.

⁴ <http://sarpy.sourceforge.net/index.php>.

Fig. 2.7. Metodo integrativo per la selezione dei valori di SF.

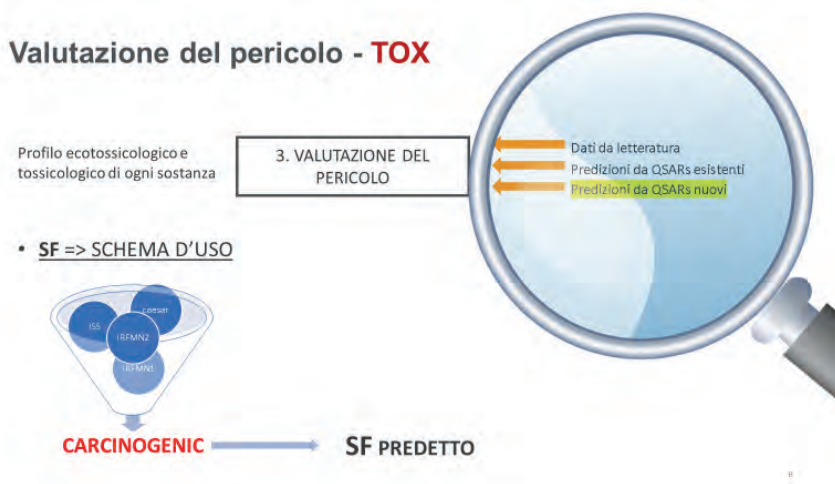
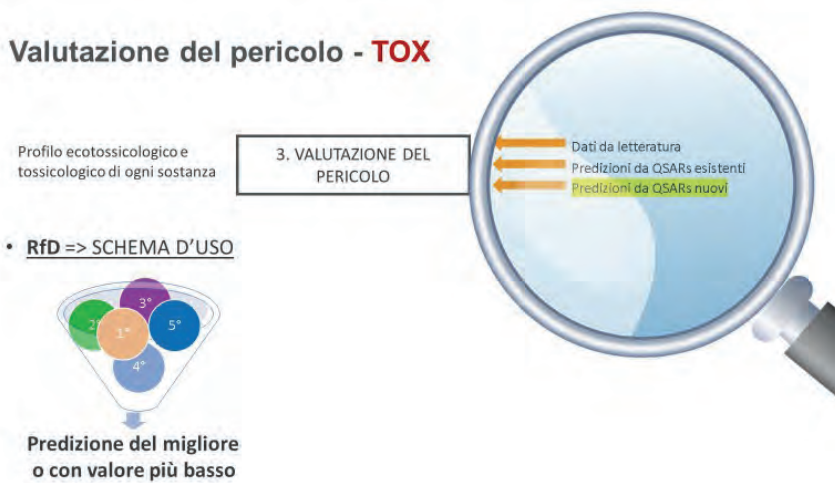


Fig. 2.8. Procedura di selezione dei valori predetti di RfD.



Per quanto riguarda le predizioni della tossicità non cancerogena, partendo da un dataset di più di 500 composti e il loro dato sperimentale di RfD abbiamo sviluppato 225 possibili modelli utilizzando un software interno al laboratorio di Laboratorio Chimica e Tossicologia dell'Ambiente dell'Istituto Mario Negri. Da queste 225 combinazioni, abbiamo selezionato cinque modelli *knearest neighbor* (k-NN) in base alle loro prestazioni (valore di R^2) e copertura.

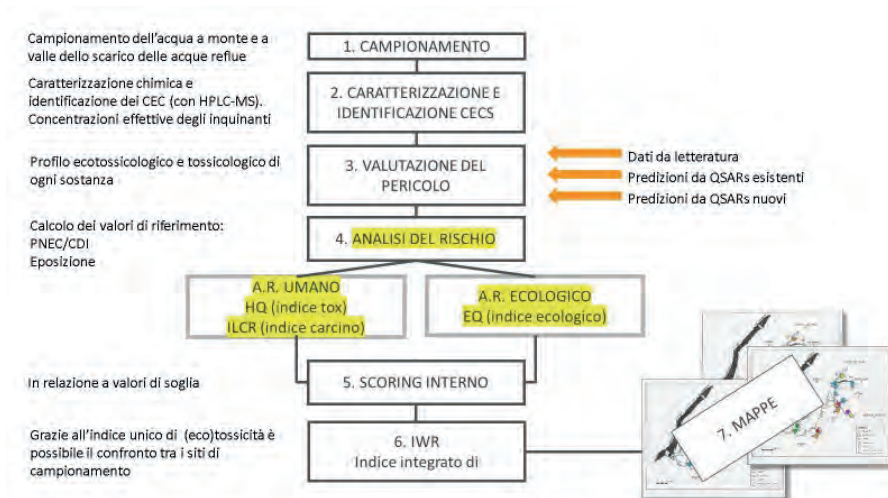
I valori delle predizioni sono stati selezionati sulla base della seguente procedura: sono state registrate le predizioni dei modelli migliori (maggiore R^2), altrimenti sono state utilizzate quelle con il valore più basso.

Solo nel caso di un analita (la ranitidina), nessuno dei cinque modelli selezionati ha fornito una predizione e quindi non è stato abbinato alcun valore di RfD.

3. ANALISI DEL RISCHIO

L'analisi del rischio è di solito associata al calcolo di dosi ammissibili per la salvaguardia delle specie ambientali, nel caso dell'analisi del rischio eco-tossicologico e della popolazione nel caso dell'analisi del rischio tossicologico. Nel primo caso, l'analisi del rischio degli inquinanti è generalmente basata sul rapporto PEC/PNEC, consistente nel confronto tra la concentrazione ambientale prevista (PEC) e le concentrazioni previste senza effetto (PNEC). Se il rapporto PEC/PNEC supera l'unità, la sostanza presenta un rischio per gli organismi nell'ambiente.

Fig. 3.1. *Analisi del rischio: calcolo dei valori di riferimento, scenari espositivi e calcolo degli indici di rischio.*



Riferendosi al rischio tossicologico invece, i valori di riferimento per la salute umana cancerogena e non cancerogena, SF e ADI/RfD rispettivamente, sono stati messi in relazione con l'assunzione giornaliera croni-

ca (*Chronic Daily Intake*, CDI) calcolata prendendo in considerazione diversi scenari espositivi.

3.1. Analisi del rischio ecologico

La relazione tra la PEC e la PNEC è stata utilizzata come indicatore (indice) di qualità eco-tossicologica (EQ) per ciascuna sostanza. Nel nostro caso, visto che abbiamo misurato le concentrazioni effettive di ogni analita tramite analisi cromatografica, abbiamo applicato la seguente equazione per il calcolo dell'EQ:

$$EQ = \frac{\text{concentrazione misurata di ogni sostanza}}{PNEC (\text{algae, Daphnia and fish})} \quad (1)$$

Per determinare la PNEC di ciascuna sostanza, abbiamo considerato diversi fattori di valutazione, in base ai dati sperimentali o alle predizioni QSAR e seguendo la procedura illustrata nella Tabella 16 del documento di orientamento tecnico (TGD) sulla valutazione del rischio, parte II ECHA (European Communities, 2003). Questa procedura consente di ottenere un adeguato valore protettivo per l'ecosistema.

Fig. 3.2. *Analisi del rischio ecologico: schematizzazione del calcolo dell'indice di qualità eco-tossicologica.*



Il fattore di valutazione più frequentemente applicato è stato 1000, poiché la maggior parte dei dati utilizzati sono stati ottenuti da test a breve termine (concentrazioni letali/efficaci che interessano il 50% della popolazione - L(E)C50) per i tre livelli trofici del set di dati. Quindi, è stato calcolato l'EQ cumulativo per ciascun sito di campionamento: considerando le possibili interazioni tra gli inquinanti riscontrati, il rischio ecologico cumulativo corrisponde alla somma EQ di tutti i composti rilevati, come esplicitato nell'equazione n. 2 (European Commission Bruxelles, s.d.; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_tossicità.pdf; Greco et al., 1992; Backhaus e Faust, 2012).

$$EQ \text{ cumulativo} = \sum \text{ singolo EQ per ogni sito di campionamento} \quad (2)$$

Fig. 3.3. *Analisi del rischio ecologico: schematizzazione del calcolo dell'indice di qualità eco-tossicologica cumulativo.*

Analisi del rischio ecologico

Codice sito	Sito	Posizione rispetto allo scarico	[Contaminante 1]	Exp/QSARs	PNEC 1	EQ 1
1	Fiume Ledra	Dopo lo scarico del Dep. di Gemona	[Contaminante 2]	Exp/QSARs	PNEC 2	EQ 2
2	Rio Bioso	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di	[Contaminante 3]	Exp/QSARs	PNEC 3	EQ 3
3	Rio Bioso	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Ma	[Contaminante 4]	Exp/QSARs	PNEC 4	EQ 4
4	Area industriale 1	A valle dello scarico della zona industriale CIP scarico dell'impianto di depurazione di Osoppo	[Contaminante n.]	Exp/QSARs	PNEC N	EQ n.
5	Area industriale 2	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Os				
6	Fiume Ledra	In corrispondenza del troppo pieno dell'impiant Gemona del Friuli				
7	Rio Artegna	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di Artegna				
8	Rio Artegna	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Artegna				
9	Rio Vedels	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di Madonna di Buia				
10	Rio Vedels	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Madonna di Buia				
11	Torrente Orvenco	Dopo lo scarico degli impianti di depurazione di Bosgo Curmanes-Montenarts				
12	Rio Avilla	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di Avilla				
13	Rio Avilla	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Avilla				
14	Primo Lago	A monte dello sbarramento				
15	Dopo Lago	A valle dello sbarramento				

$$EQ \text{ cumulativo} = \sum \text{ singolo EQ per ogni sito di campionamento}$$

3.2. Analisi del rischio per la salute umana: rischio tossicologico non cancerogeno

Per la salute umana, abbiamo utilizzato la seguente procedura basata sui valori di ADI (dose giornaliera ammissibile) e RfD (dose di riferimento). L'ADI è definita come la quantità di una sostanza alla quale una persona può essere esposta quotidianamente per tutta la vita senza effetti nocivi

(Government of Canada, s.d.). Si basa sul rapporto tra il livello al quale non si osservano effetti avversi (NOAEL), stabilito sperimentalmente, e il fattore di sicurezza (SaF), come segue:

$$\text{ADI (dose umana)} = (\text{NOAEL (dose sperimentale)}) / \text{SaF} \quad (3)$$

dove:

SaF è solitamente un multiplo di 10 e rappresenta un'area specifica di incertezza inerente alla validità dei dati che tiene conto delle possibili differenze nella risposta tra uomo e animale negli studi a lungo termine. In caso di dati NOAEL (o NOEL) mancanti, l'ADI potrebbe essere determinata facendo riferimento al livello più basso di effetti avversi osservati (LOAEL) e applicando un ulteriore SaF.

La RfD deriva dal rapporto tra i dati di NOAEL e i diversi fattori di sicurezza ed è definita come una stima dell'esposizione giornaliera della popolazione umana (compresi i sottogruppi sensibili) ritenuta priva di rischio di effetti avversi per la salute anche quando l'esposizione persiste per tutta la vita (US EPA, 1993).

In considerazione della loro somiglianza concettuale, abbiamo considerato l'ADI e la RfD delle sostanze come parametri interscambiabili durante lo sviluppo di questo lavoro.

In generale, l'indice di rischio tossicologico non cancerogeno (HQ) per ciascuna sostanza è espresso dal rapporto tra l'assunzione giornaliera cronica (CDI) e il valore di riferimento:

$$\text{HQ} = \text{CDI} / (\text{RfD o ADI}) \quad (4)$$

Abbiamo calcolato il valore di CDI in caso di ingestione accidentale di acqua utilizzando la seguente equazione:

$$\text{CDI} = C \times (\text{IR} \times \text{EF} \times \text{ED}) / (\text{BW} \times \text{AT}) \quad (5)$$

dove:

C è la concentrazione della sostanza nell'acqua (mg/L);

IR è l'acqua ingerita (L/giorno);

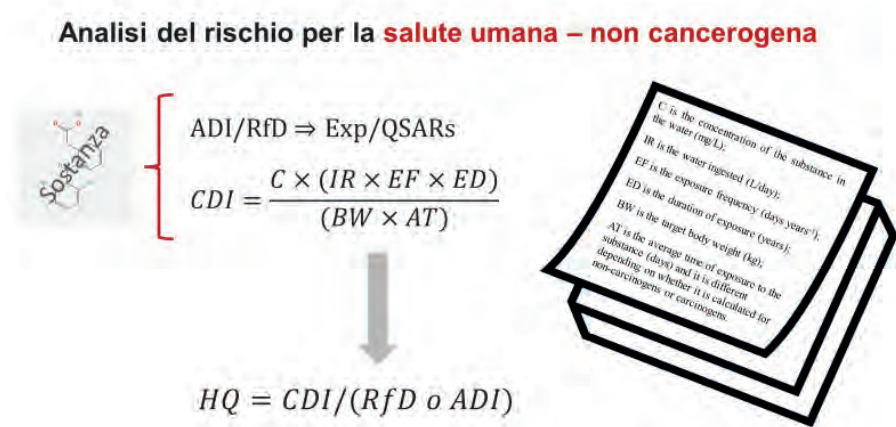
EF è la frequenza di esposizione (giorni anni^{-1});

ED è la durata dell'esposizione (anni);

BW è il peso corporeo target (kg);

AT è il tempo medio di esposizione alla sostanza (giorni) ed è diverso a seconda che sia calcolato per la valutazione del rischio non cancerogeno o cancerogeno. L'assunzione nella valutazione di cancerogenicità è una dose cumulativa proporzionale nel corso della vita (70 anni), mentre quella nella valutazione non cancerogena è calcolata in media solo sulla durata dell'esposizione.

Fig. 3.4. *Analisi del rischio per la salute umana: schematizzazione del calcolo dell'indice di qualità tossicologica, non cancerogena.*



In considerazione del fatto che ‘sotto esame’ era l’acqua di un fiume e non l’acqua potabile, per stimare uno scenario di esposizione più plausibile abbiamo limitato la valutazione dell’esposizione al periodo più caldo dell’anno (Enault et al., 2015; Jones et al., 2014), quindi considerando solo i tre mesi estivi. La frequenza all’esposizione invece è stata stimata un giorno alla settimana, per un totale di 12 giorni nell’anno.

Inoltre, si è presunto che durante questo periodo specifico di tempo, le attività che più plausibilmente potessero essere svolte dall’uomo fossero il nuoto, la pesca e la canoa. Solo nel caso del nuoto, abbiamo preso in esame anche la situazione più estrema e cioè che a nuotare nell’acqua del fiume ci potessero essere dei bambini di età compresa tra i 3 e i 16 anni, mentre per la pesca e la canoa i calcoli sono stati effettuati solo per gli adulti.

Abbiamo fatto riferimento ai parametri di esposizione riportati da Schets (Schets et al., 2011) relativi alla durata e la quantità di acqua ingerita durante il nuoto sia per gli adulti che per i bambini: 0.027 L di acqua ingerita da un adulto che nuota 54 minuti al giorno e 0.037 L di acqua ingerita in 79 minuti al giorno per i bambini.

Per la pesca e la canoa (gli sport più diffusi in questo campo), abbiamo adottato i parametri mostrati da Dorevitch (Dorevitch et al., 2011), stimando 0.0039 L/h e 0.0036 L/h come ingestione accidentale di acqua rispettivamente durante l'attività del canottaggio e della pesca. Abbiamo stimato 2 ore al giorno per la canoa e 5 ore al giorno per la pesca. Infine, abbiamo immaginato lo scenario espositivo più estremo: un bambino, di età compresa tra i 3 e i 16 anni, che beve 1 L di acqua di fiume ogni giorno dell'anno per tutta la sua vita. La Tabella 3.1 riassume i cinque scenari di esposizione usati nella nostra valutazione e i loro acronimi nelle formule per il calcolo della CDI (US EPA, 2011).

Tab. 3.1. Cinque diversi scenari di esposizione all'acqua di fiume tenendo conto la tossicità umana non cancerogena.

Scenario di esposizione	IR (L./giorno)	EF (giorni anni ⁻¹)	ED (anni)	BW (kg)	AT (giorni)	
					non C	C
Nuoto, adulti	0.027	12	24	70	8760	25550
Nuoto, bambini tra i 3 e i 16 anni	0.037	12	13	35.73	4745	25550
Canoa	0.0078	12	24	70	8760	25550
Pesca	0.018	12	24	70	8760	25550
Ingestione acqua, bambini tra i 3 e i 16 anni	1	365	13	35.73	4745	25550

3.3. Analisi del rischio per la salute umana: rischio tossicologico cancerogeno

L'indice di rischio per gli effetti cancerogeni (*Increased Lifetime Cancer Risk*, ILCR) è stato calcolato moltiplicando la CDI di ciascuna sostanza sopra descritta per il suo SF (US EPA, 2005):

$$ILCR = CDI \times SF \quad (6)$$

Il SF è la pendenza della retta che esprime la dose/risposta per l'inquinante considerato come una funzione lineare, definendo la probabilità di casi di cancro incrementali nella vita per unità di dose. Per la valutazione del rischio umano, la mancanza di informazioni su proprietà come ADI, RfD e SF per i composti identificati è stata compensata dalle predizioni dei nuovi modelli QSAR.

Fig. 3.5. *Analisi del rischio per la salute umana: schematizzazione del calcolo dell'indice di qualità tossicologica cancerogena.*



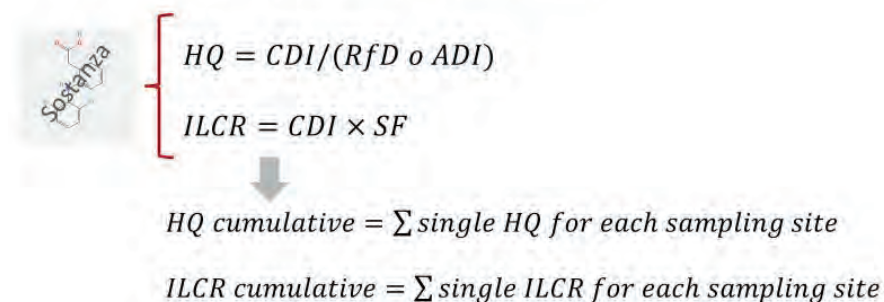
Dopo aver ottenuto i dati necessari, abbiamo calcolato gli indici di rischio per salute umana (HQ e ILCR) per ciascuna sostanza e quelli cumulativi per ogni sito di campionamento, come descritto dalle seguenti formule:

$$HQ \text{ cumulato} = \sum \text{singolo HQ per ogni sito di campionamento} \quad (7)$$

$$ILCR \text{ cumulativo} = \sum \text{singolo ILCR per ogni sito di campionamento} \quad (8)$$

Fig. 3.6. *Analisi del rischio per la salute umana: schematizzazione del calcolo degli indici di qualità tossicologica cancerogena e non.*

Analisi del rischio per la **salute umana**



4. METODO DI SCORING E INDICE INTEGRATO DI RISCHIO

4.1. Scoring interno

Dopo aver calcolato l'indice cumulativo di (eco)tossicità (EQc, HQc e ILCRc) per ciascun sito di campionamento, è stato necessario standardizzarne i risultati, altrimenti troppo diversi tra di loro per poter essere messi a confronto.

Seguendo l'approccio ERICA (Boriani et al., 2010), ogni indice cumulativo è stato tradotto in un valore comparabile grazie all'utilizzo di un sistema di *scoring* interno che tiene conto di una scala numerica continua di valori soglia, o valori di riferimento come descritto nella Tabella 4.1.

Tab. 4.1. *Valori di riferimento/soglia secondo la legislazione e le linee guida ufficiali (ISS ed EPA) per quanto riguarda il calcolo dello scoring interno a livello (eco)tossicologico.*

Range score		Benchmark values for EQ and HQ indices		Benchmark values for ILCR index	
SClo	SChi	Vlo	Vhi	Vlo	Vhi
0	1	0.000	0.010	0	1.0E-07
1.0	4	0.010	0.10	1.0E-07	1.0E-06
4	8	0.10	1.0	1.0E-06	1.0E-05
8	16	1	5	1.0E-05	1.0E-04
16	24	5	10	1.0E-04	1.0E-03
24	32	10	100	1.0E-03	1.0E-02
32	64	100	1000	1.0E-02	1.0E-01
64	128	1000	10000	1.0E-01	1.0E+00

Partendo dall'analisi del rischio ecologico, il valore ponderato di ogni indice cumulativo, per ogni sito di campionamento, è risultato dall'applicazione dell'equazione qui sotto riportata (n. 10):

$$EQc \text{ score} = \left\{ \left[\frac{(SChi - SClo)}{(Vhi - Vlo)} \right] \times (EQc - Vlo) \right\} + SClo \quad (9)$$

dove:

SClo è il punteggio più basso corrispondente al range di valori di riferimento dove cade l'indice ecologico cumulativo (EQc);

SChi è il punteggio più alto corrispondente al range di valori di riferimento dove cade l'EQc;

Vlo è il riferimento più basso nell'intervallo dove cade l'EQc;

Vhi è il riferimento più alto nell'intervallo dove cade l'EQc.

Così come era stato per la valutazione del rischio ecologico, anche nel caso della standardizzazione degli indici cumulativi, la traduzione nel corrispondente score è stata estesa anche agli indici per la salute umana (HQsc e ILCRsc), uno per ogni scenario espositivo.

Fig. 4.1. Per ogni sito di campionamento sono stati calcolati i valori standardizzati di ogni indice cumulativo, per la valutazione sia della salute ambientale che umana.

Calcolo dello Scoring interno			EQsc 1	HQsc 1	ILCRsc 1
			EQsc 2	HQsc 2	ILCRsc 2
			EQsc 3	HQsc 3	ILCRsc 3
			EQsc 4	HQsc 4	ILCRsc 4
1	Fiume Ledra	Dopo lo scarico del Dep. di Gemona	EQsc 5	HQsc 5	ILCRsc 5
2	Rio Bosso	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di	EQsc 6	HQsc 6	ILCRsc 6
3	Rio Bosso	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Ma	EQsc 7	HQsc 7	ILCRsc 7
4	Area industriale 1	A valle dello scarico della zona industriale CIP, scarico dell'impianto di depurazione di Osoppo	EQsc 8	HQsc 8	ILCRsc 8
5	Area industriale 2	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Os	EQsc 9	HQsc 9	ILCRsc 9
6	Fiume Ledra	In corrispondenza del troppo pieno dell'impianto Gemona del Friuli	EQsc 10	HQsc 10	ILCRsc 10
7	Rio Artegna	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di	EQsc 11	HQsc 11	ILCRsc 11
8	Rio Artegna	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Av	EQsc 12	HQsc 12	ILCRsc 12
9	Rio Vedelis	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di	EQsc 13	HQsc 13	ILCRsc 13
10	Rio Vedelis	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Ma	EQsc 14	HQsc 14	ILCRsc 14
11	Torrente Orveneco	Dopo lo scarico degli impianti di depurazione Montenatis	EQsc 15	HQsc 15	ILCRsc 15
12	Rio Avilla	Prima dello scarico dell'impianto di depurazione di			
13	Rio Avilla	Dopo lo scarico dell'impianto di depurazione di Avilla		Avilla, Buja	
14	Prima Lago	A monte dello sbarramento		Gemona del Friuli	
15	Dopo Lago	A valle dello sbarramento		Gemona del Friuli	

4.2. Indice integrato di rischio IRW: metodo

A seguito dell'applicazione dello *scoring* interno, i valori tradotti degli indici cumulativi sono comparabili tra di loro. Quindi, considerando i loro contributi equivalenti e tenendo conto di ogni scenario d'esposizione, ne abbiamo sommato gli score; la loro media corrisponde al singolo valore che indica l'indice integrato di rischio (IRW), come mostrato nell'equazione n. 11:

$$IRW = \sum_{i=1}^5 (EQsc + HQsc + ILCRsc)_i / 5 \quad (10)$$

Inoltre, per ogni sito di campionamento, gli score integrati e quelli singoli degli indici ecologici e umani, hanno potuto essere associati al rischio potenziale e relativo giudizio di qualità delle acque superficiali, come mostrato nella Tabella 4.2, applicando le seguenti equazioni:

$$ERA \text{ numerical index} = EQc \text{ score} / 8 \quad (11)$$

$$HRA \text{ numerical index} = \sum_{i=1}^5 [(HQc \text{ score} + ILCRc \text{ score}) / 16]_i / 5 \quad (12)$$

$$GRA \text{ numerical index} = IRW / 24 \quad (13)$$









dove:

ERA (*Ecological Risk Assessment*) corrisponde alla valutazione del rischio ecologico;

HRA (*Human Risk Assessment*) corrisponde alla valutazione del rischio per la salute umana;

GRA (*Global Risk Assessment*) corrisponde alla valutazione del rischio globale.

Tab. 4.2. *Giudizio del rischio potenziale e relativa qualità delle acque di superficie per l'interpretazione delle mappe (eco)tossicologiche del fiume Ledra.*

EQ e HQ (soglia 1)	ILCR (soglia 10^{-5})	Range di indice numerico	GRP	QAS	Colore
<0.1	< 10^{-6}	<0.25	Rischio da trascurabile a molto basso	Da molto buona a buona	
0.1 - 1	10^{-6} - 10^{-5}	0.25 - 0.5	Rischio da molto basso a basso	Da buona a moderata	
1	10^{-5}	0.5 - 1	Rischio da basso a moderato	Da moderata a insalubre per i gruppi sensibili	
1 - 5	10^{-5} - 10^{-4}	1 - 1.5	Rischio da moderato a rilevante	Da insalubre per i gruppi sensibili a insalubre	
5 - 10	10^{-4} - 10^{-3}	1.5 - 2	Rischio da rilevante a molto rilevante	Da insalubre a molto insalubre	
10 - 100	10^{-3} - 10^{-2}	2 - 3	Rischio da alto a molto alto	Da molto insalubre a cattiva	
100 - 1000	10^{-2} - 10^{-1}	3 - 4	Rischio da molto alto a pericoloso	Da cattiva a molto cattiva	
>1000	> 10^{-1}	≥ 4	Rischio pericoloso	Pessima	

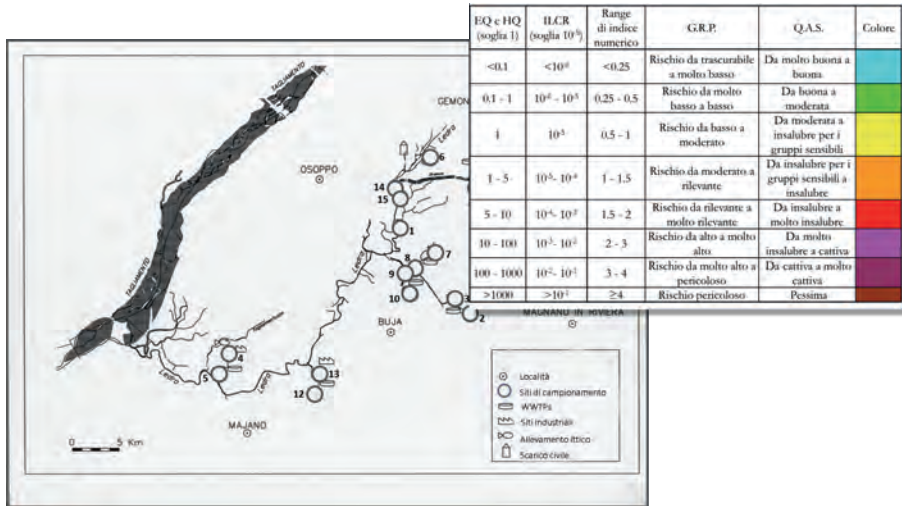
Nota: GRP = Giudizio di Rischio Potenziale; QAS = Qualità delle Acque di Superficie.

Il valore soglia applicato agli indici per il rischio ecologico e quello per la salute umana (non cancerogeno e cancerogeno) è stato fissato a 1 e 10^{-5} rispettivamente.

Grazie all'indice unico di (eco)tossicità (IRW) è stato possibile il confronto tra i siti di campionamento.

Secondo i criteri sopra descritti, la qualità delle acque può variare da 'Molto buona' con un giudizio del rischio potenziale 'Trascurabile' a 'Pessima', con un giudizio del rischio potenziale 'Pericoloso'. I diversi colori, abbinati ai diversi giudizi di rischio e qualità delle acque di superficie, servono a rendere più intuitivo e immediato il quadro (eco)tossicologico generale; infatti, i colori corrispondenti al giudizio del rischio e alla qualità delle acque caratterizzeranno i siti di campionamento. Diverse sono le mappe cromatiche che ne possono derivare. A seconda dell'ambito cui si fa riferimento, ci possono essere mappe cromatiche che fotografano la condizione del fiume Ledra solo dal punto di vista del rischio ambientale, oppure da quello del rischio per la salute umana o ancora da un punto di vista globale, che tiene conto cioè di entrambe le potenzialità.

Fig. 4.2. I cerchi con cui si identificano i siti di campionamento si coloreranno a seconda di quale sarà il risultato del giudizio di rischio potenziale e della qualità delle acque ad esso associato, per ciascuno degli ambiti della valutazione (ambientale e umana) o entrambi.



5. RISULTATI

5.1. Caratterizzazione e identificazione CECs

La spettrometria di massa ha permesso di identificare e quantificare 47 CEC dai campioni di acqua prelevata, tra cui 19 prodotti farmaceutici, 21 pesticidi e 7 droghe da abuso. La Tabella 5.1 ne riporta i nomi in ordine alfabetico.

Tab. 5.1. *I 47 composti trovati nei campioni d'acqua del fiume Ledra e quantificati tramite spettrometria di massa.*

1H-Benzotriazole	Diazepam	Methadone
2-Hydroxyatrazine	Diazinon	Metolachlor
2-Hydroxyterbutylazine	Diclofenac	Metolachlor ESA
Amoxicillin	Diuron	Metribuzin
Atenolol	EDDP***	Morphine
Atorvastatin	Enalapril	-N,N-Diethyltoluamide
Atrazine	Flufenacet	Naproxen
Benzophenone	Furosemide	Nicosulfuron
Benzoilecgonine**	Hydrochlorothiazide	Paracetamol
Bezafibrate	Ibuprofen	Penconazole
Carbamazepine	Imidacloprid	Piperonyl-butoxide
Carbendazim	Ketoprofen	Ranitidine
Clarithromycin	Lincomycin	Salbutamol
Codeine	Linuron	Terbutylazine
Demethyl-diazepam	MDMA*	Thiophanate-methyl
Desethylterbutylazine	Metamphetamine	

Nota: * MDMA, o Ecstasy: 3,4-metilendioossimetam-fetamina; ** BE (benzoilecgonina): metabolita della cocaina; *** EDDP (2-etiliden-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina): metabolita ciclico del metadone.

Oltre ai composti classicamente considerati nel campo della politica idrica (come, ad esempio, atrazina e diuron), sono state rilevate sostanze come diclofenac, imidacloprid e claritromicina. Queste sostanze chimiche sono elencate nella (UE) 2015/495 della Commissione del 20 marzo 2015 come composti prioritari monitorati in Europa.

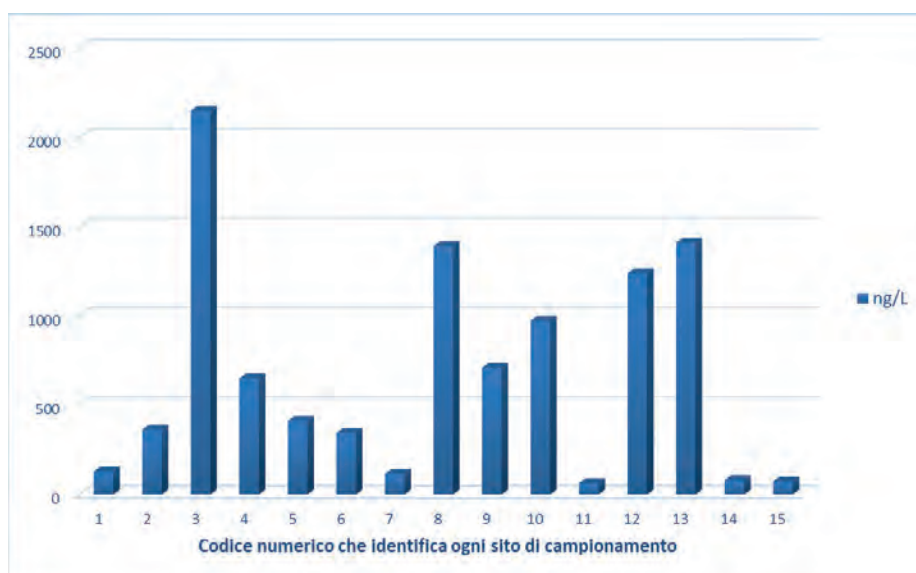
Tab. 5.2. *Lista dei composti trovati in ogni sito di campionamento e delle loro concentrazioni in ng/L.*

Nome del composto	Codice del sito														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diclofenac		11	134	14	7	8.3		151	9.6	48		43	82	18	10
Imidacloprid			30					30					20		
Clarithromycin		3.1	83		2.4	1.9		192	40	54		49	89		
Salbutamol			9					7.4		2.5		3.1	4.9		
Atenolol			42			11		21		7.4		4.6	9.6		
Carbamazepine		3.1	83		2.4	1.9		192	40	54		49	89		
Demethyl-diazepam		2.2	3.5					4	2.5	2.4		2.3			
Diazepam			2.8			2.3		2.4	2.3	2.3					
Ranitidine			18	2.8		2		19		2.8					
Amoxicillin			131			22			5.4				5.8		
Enalapril			8.5	2.1	2.6	3.3			1.4	2.4		1.9	1.7		
Lincomycin												0.74	0.44		
Atorvastatin			6.6							5.9		3.8			
Bezafibrate									4.2	30					
Furosemide	5.7	42	50	10	15	18		149	18	26		42	72		
Ibuprofen	22	6.3	675	103	63	99			61	155		159	88		
Hydrochlorothiazide			27	5.2		7.5		67	13	18		12	46		
Ketoprofen	12	13	36	14	6.7	12	4.5	35	17	60	2.6	32	55		2.8
Naproxen	3.8	9.5	86	12	5.4	14		16	9	29		46	48		
Paracetamol	15	42		13	14	63		2.4		2.1			2.5	1.8	
1H-Benzotriazole		10	130	310	190			180	10	50		50	100		
2-Hydroxyatrazine												20	10		
2-Hydroxyterbutylazine							10	20				30	20		
Atrazine													10		
Benzophenone	10		60	20				10	10	20		10	10		
Carbendazim			20												
-N,N-Diethyltoluamide		10	180					10	20	50		60	40		
Diazinon								70							
Diuron			50												

Flufenacet										30					
Linuron		20	10												
Metolachlor		70	50	40	20	10		20	120	100	120	50			
Metolachlor ESA								40	30	50	30	250	130		
Metribuzin			10							40	30	30			
Nicosulfuron									30						
Penconazole														220	
Piperonyl-butoxide	60	80	80	60	60	60	60	60	60	70	60	80	70	60	60
Terbutylazine		40	20	30	20				20	120	90		70	50	
Desethylterbutylazine													20	30	
Thiophanate-methyl				10									30	20	
Metamphetamine									1.1		3.4	5.1	3.8		
MDMA*										4.8					
Benzoylcegonine**			6.8				1.1			6	3.1				
Morphine			47				3.9				16				
Codeine			31						4.1		2.1	4.5	5.3		
EDDP***			24	2.8	1.4	2.1			34	13	4.8	8.9	23		
Methadone		0.15	4.8	1.3	0.39	0.24			13	1.9	0.65	1.7	3.1		

Nota: * MDMA, or Ecstasy: 3,4-methylenedioxyamphetamine; ** BE (benzoylcegonine): cocaine metabolite; *** EDDP (2-ethylidene-1, 5-dimethyl-3, 3-diphenylpyrrolidine): cyclic methadone metabolite.

Fig. 5.1. Concentrazione totale di analiti trovati in ogni sito di campionamento.



Il grafico in Figura 5.1 mostra l'andamento delle concentrazioni totali di analiti per ogni sito di campionamento.

I siti di campionamento 3, 8, 10, 12 e 13 sono risultati avere le concentrazioni di analiti cumulative più elevate.

5.2. Valutazione del pericolo

5.2.1. Dati disponibili di tossicità umana: valori sperimentali e predetti relativi ai contaminanti trovati. Dalla ricerca in letteratura (vedi paragrafo 2.3.2), sono stati ricavati i valori sperimentali di ADI e/o RfD per 25 dei 47 contaminanti trovati nelle acque del fiume Ledra. Per la maggior parte si è trattato di valori di ADI, ad eccezione di atrazina, diazinon, diuron, linu-ron, metolaclo, metribuzin e tiofanato-metile per i quali sono stati trovati i valori di RfD. Quando entrambi i valori, di RfD e ADI, erano disponibili per lo stesso composto, si è verificato che tali valori coincidessero – come nel caso di linuron – o differissero solo leggermente. Per le restanti 22 sostanze, per le quali non sono stati trovati valori sperimentali né di ADI né di RfD, tali valori sono stati resi disponibili grazie alle predizioni dei nuovi modelli QSAR, sviluppati *ad hoc* per il progetto. Sono stati usati solo i valori derivanti da predizioni ‘affidabili’, come spiegato nel paragrafo 2.3.2.

Questo per quanto riguarda la valutazione della tossicità umana non cancerogena. Per quanto riguarda invece la valutazione della tossicità umana cancerogena, seguendo lo schema metodologico esposto precedentemente (2.3.2), 27 dei 47 contaminanti sono stati predetti cancerogeni dal sistema integrato dei quattro modelli classificatori e conseguentemente per queste molecole è stato calcolato il valore di SF. Imidacloprid, atenolol, 2-hydroxybutylazine, terbutylazine, nicosulfuron e MDMA hanno mostrato i valori di SF più significativi, e vanno da 2.58 di MDMA a 75.57 di atenolol.

5.3. Analisi del rischio

5.3.1. *Analisi del rischio ecologico.* Il valore di PNEC, calcolato per ciascun composto trovato nel fiume Ledra, come descritto nel paragrafo 3.1, varia da 0.002 µg/L per claritromicina e ranitidina a 1000 µg/L per amoxicillina (vedi Tabella 5.3). Considerando l'indice EQ cumulativo, 10 siti di campionamento su 15 hanno dato un valore superiore all'unità, presentando quindi un possibile rischio eco-tossicologico (vedi valori evidenziati nella Tabella 5.4) (European Communities, 2003). Il sito di campionamento con la situazione ambientale peggiore risulta essere in questo modo il n. 8 anche se non coincide con quello con la più alta concentrazione di analiti, che invece era risultato essere il sito n. 3, come illustrato nella Figura 5.1. La differenza potrebbe essere spiegata considerando il valore dell'indice EQ di claritromicina e furosemide, molto più alto nel sito 8 rispetto al sito 3 soprattutto per la claritromicina, e con la presenza di diazinon, solo nel sito di campionamento n. 8, che ha un valore dell'indice EQ più elevato rispetto agli altri contaminanti.

Tab. 5.3. *RfD/ADI, Slope Factor (SF) e PNEC per ciascuna sostanza. In grassetto i valori di SF più significativi.*

Contaminanti	Tossicità umana		Tossicità ambientale
	RfD/ADI (mg)	SF	PNEC (mg)
1H-Benzotriazole	2.27E-02		4.51E-03
2-Hydroxyatrazine	2.25E-02		1.00E-02
2-Hydroxyterbutylazine	4.00E-03	4.37	5.18E-03
Amoxicillin	4.30E-04		1.00E+00
Atenolol	2.70E-03	75.57	1.48E-01
Atorvastatin	6.70E-03	0.36	1.00E-02
Atrazine	2.00E-02	0.22	5.00E-05
Benzophenone	1.20E-02	0.03	4.00E-03
Benzoylcegonine	2.80E-02		5.55E-03
Bezofibrate	2.33E-02	0.25	1.20E-03
Carbamazepine	1.00E-02	0.1	1.99E-02
Carbendazim	2.00E-02		3.00E-05
Clarithromycin	2.00E-04		2.00E-06

Codeine	2.41E-03		1.43E-02
Demethyl-diazepam	6.90E-03		7.30E-04
Desethylterbutylazine	9.38E-03		1.40E-04
Diazepam	1.00E-03		9.83E-04
Diazinon	2.00E-04		5.60E-05
Diclofenac	6.70E-02	0.06	4.80E-04
Diuron	2.00E-03		2.70E-05
EDDP	4.77E-02		4.40E-05
Enalapril	2.30E-04		3.45E-02
Flufenacet	9.45E-03	0.01	2.04E-05
Furosemide	2.36E-02	0.51	6.11E-05
Hydrochlorothiazide	5.00E-02		2.01E-02
Ibuprofen	7.57E-02		2.00E-03
Imidacloprid	6.00E-02	6.92	1.80E-01
Ketoprofen	1.00E-03		2.04E-03
Lincomycin	1.00E+00	0.04	3.00E-03
Linuron	2.00E-03		1.60E-04
MDMA	4.49E-03	2.58	2.30E-03
Metamphetamine	7.29E-03		2.52E-03
Methadone	3.76E-02		1.72E-04
Metolachlor	1.50E-01	0.02	6.03E-03
Metolachlor ESA	4.00E-02	0.01	4.35E-03
Metribuzin	1.30E-02	0	1.90E-03
Morphine	1.24E-03		1.96E-02
-N,N-Diethyltoluamide	3.18E-02		6.63E-02
Naproxen	5.70E-01		2.42E-02
Nicosulfuron	2.00E+00	21.8	1.43E-02
Paracetamol	5.00E-02	0.01	3.50E-03
Penconazole	3.00E-02	0.1	1.20E-03
Piperonyl-butoxide	2.00E-01	0.26	2.40E-04
Ranitidine			2.46E-06
Salbutamol	2.48E-02	1.47	3.30E-02
Terbutylazine	4.00E-03	0.08	2.00E-04
Thiophanate-methyl	8.00E-02	0.01	3.60E-03

5.3.2. *Analisi del rischio per la salute umana.* Come detto in precedenza (paragrafo 5.2.1.), grazie alle predizioni dei modelli QSAR, è stato possibile avere a disposizione dati sufficienti per calcolare gli indici cumulativi per la tossicità umana cancerogena e non per ciascun sito di campionamento. La Tabella 5.4 elenca tali indici, insieme a quello EQ, considerando le diverse modalità di esposizione.

Tab. 5.4. *Per ogni sito di campionamento sono riportati i valori dei tre indici cumulativi di (eco)tossicità.*

	EQc	HQc					ILCRc				
	(1)	(1)					(10^{-5})				
ID		N.A.	N.B.	Canoa	Pesca	IA	N.A.	N.B.	Canoa	Pesca	IA
1	0.37	1.77E-07	4.76E-07	5.12E-08	1.18E-07	3.91E-04	8.17E-11	1.19E-10	2.36E-11	5.45E-11	9.77E-08
2	2.96	6.80E-07	1.83E-06	1.97E-07	4.53E-07	1.50E-03	2.09E-10	3.05E-10	6.05E-11	1.40E-10	2.50E-07
3	53.9	1.19E-05	3.20E-05	3.45E-06	7.96E-06	2.63E-02	1.51E-08	2.19E-08	4.35E-09	1.00E-08	1.80E-05
4	1.95	6.23E-07	1.67E-06	1.80E-07	4.15E-07	1.37E-03	1.11E-10	1.61E-10	3.20E-11	7.39E-11	1.33E-07
5	1.93	5.83E-07	1.56E-06	1.68E-07	3.88E-07	1.29E-03	1.13E-10	1.64E-10	3.26E-11	7.51E-11	1.35E-07
6	2.45	1.28E-06	3.43E-06	3.69E-07	8.52E-07	2.82E-03	3.73E-09	5.42E-09	1.08E-09	2.49E-09	4.46E-06
7	0.26	1.05E-07	2.83E-07	3.04E-08	7.02E-08	2.32E-04	2.58E-10	3.75E-10	7.45E-11	1.72E-10	3.08E-07
8	109	1.79E-05	4.80E-05	5.16E-06	1.19E-05	3.94E-02	1.16E-08	1.69E-08	3.35E-09	7.74E-09	1.39E-05
9	23.1	3.63E-06	9.76E-06	1.05E-06	2.42E-06	8.02E-03	2.43E-10	3.53E-10	7.02E-11	1.62E-10	2.91E-07
10	29.7	5.13E-06	1.38E-05	1.48E-06	3.42E-06	1.13E-02	2.71E-09	3.94E-09	7.82E-10	1.80E-09	3.24E-06
11	0.25	3.68E-08	9.87E-08	1.06E-08	2.45E-08	8.12E-05	6.69E-11	9.73E-11	1.93E-11	4.46E-11	8.00E-08
12	26.5	4.36E-06	1.17E-05	1.26E-06	2.90E-06	9.62E-03	2.37E-09	3.44E-09	6.84E-10	1.58E-09	2.83E-06
13	47.7	7.40E-06	1.99E-05	2.14E-06	4.93E-06	1.63E-02	4.60E-09	6.69E-09	1.33E-09	3.07E-09	5.50E-06
14	0.29	7.67E-09	2.06E-08	2.22E-09	5.11E-09	1.69E-05	7.15E-11	1.04E-10	2.06E-11	4.76E-11	8.54E-08
15	0.27	4.12E-08	1.11E-07	1.19E-08	2.75E-08	9.09E-05	6.94E-11	1.01E-10	2.00E-11	4.63E-11	8.29E-08

Nota: Per quanto riguarda l'indice cumulativo EQ (EQc) sono evidenziati in grigio quelli che superano l'unità e che quindi presentano un possibile rischio eco-tossicologico. I valori degli altri due indici cumulativi di tossicità umana (HQc e ILCRc) tengono conto delle diverse vie di esposizione. Per gli indici EQc e HQc la soglia di rischio è 1 mentre per l'indice ILCRc la soglia è (10^{-5}) . ID = codice del sito; N.A. = nuoto adulti; N.B. = nuoto bambini in un'età compresa tra i 3 e i 16 anni; IA = ingestione di acqua.

Sono stati evidenziati i valori più significativi dal punto di vista del rischio per la salute ambientale e umana perché o maggiori (nel caso del rischio ambientale) o vicini alla soglia. In entrambi i casi, rischio per la salute umana cancerogeno e non, lo scenario espositivo che tiene conto dell'ingestione di acqua ha nuovamente dato l'esito peggiore, con valori elevati non solo nei siti 3 e 8, per ILCR, ma anche 10 e 13, per HQ.

5.4. Indice integrato di rischio: IRW

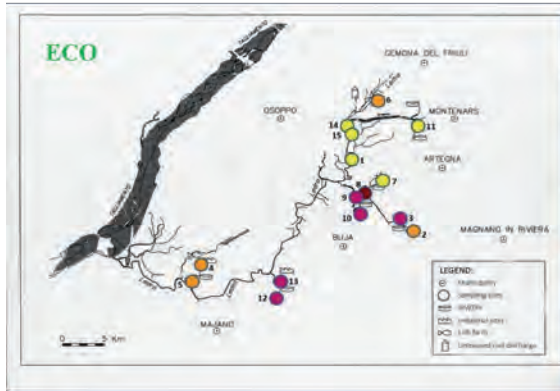
Avendo potuto calcolare gli indici di rischio cumulativi per ogni sito di campionamento, sono stati anche possibili l'applicazione dello score interno e la conseguente traduzione dei valori nel giudizio di rischio potenziale e nella qualità relativa alle acque superficiali.

I valori '1' per gli indici EQ e HQ e '10⁻⁵' per l'indice IRLC vanno considerati come le soglie oltre le quali il rischio potenziale sale da 'basso' a 'moderato' e la qualità delle acque da 'moderata' a 'malsana per soggetti sensibili gruppi' con un limite fissato ad '1' nella colonna 'Range di indice numerico'.

Fig. 5.2. Nella figura viene evidenziata la linea dei valori soglia oltre i quali il giudizio del rischio e la qualità delle acque vanno da 'basso' a 'moderato' e da 'moderata' a 'insalubre' rispettivamente.

EQ e HQ (soglia 1)	ILCR (soglia 10 ⁻⁵)	Range di indice numerico	G.R.P.	Q.A.S.	Colore
<0.1	<10 ⁻⁶	<0.25	Rischio da trascurabile a molto basso	Da molto buona a buona	
0.1 - 1	10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁵	0.25 - 0.5	Rischio da molto basso a basso	Da buona a moderata	
1	10⁻⁵	0.5 - 1	Rischio da basso a moderato	Da moderata a insalubre per i gruppi sensibili	
1 - 5	10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁴	1 - 1.5	Rischio da moderato a rilevante	Da insalubre per i gruppi sensibili a insalubre	
5 - 10	10 ⁻⁴ - 10 ⁻³	1.5 - 2	Rischio da rilevante a molto rilevante	Da insalubre a molto insalubre	
10 - 100	10 ⁻³ - 10 ⁻²	2 - 3	Rischio da alto a molto alto	Da molto insalubre a cattiva	
100 - 1000	10 ⁻² - 10 ⁻¹	3 - 4	Rischio da molto alto a pericoloso	Da cattiva a molto cattiva	
>1000	>10 ⁻¹	≥4	Rischio pericoloso	Pessima	

Fig. 5.3. *Mappa cromatica: rischio potenziale ambientale e corrispondente qualità delle acque.*



ERA indice numerico = EQc score/8

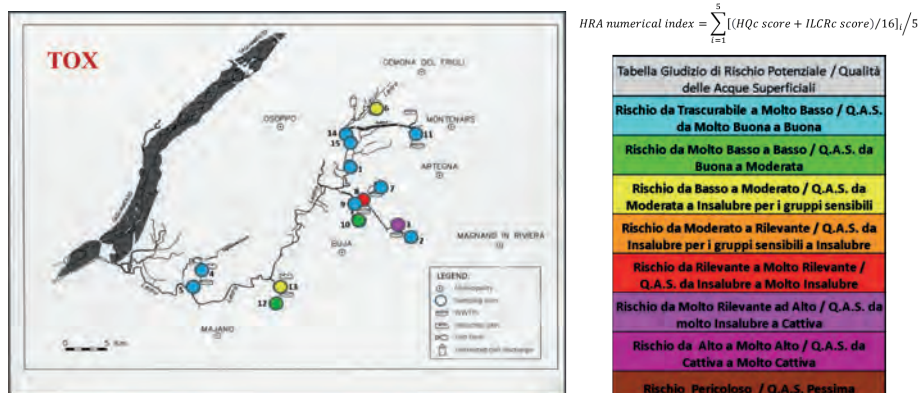
Tabella Giudizio di Rischio Potenziale / Qualità delle Acque Superficiali
Rischio da Trascurabile a Molto Basso / Q.A.S. da Molto Buona a Buona
Rischio da Molto Basso a Basso / Q.A.S. da Buona a Moderata
Rischio da Basso a Moderato / Q.A.S. da Moderata a Insalubre per i gruppi sensibili
Rischio da Moderato a Rilevante / Q.A.S. da Insalubre per i gruppi sensibili a Insalubre
Rischio da Rilevante a Molto Rilevante / Q.A.S. da Insalubre a Molto Insalubre
Rischio da Molto Rilevante ad Alto / Q.A.S. da molto Insalubre a Cattiva
Rischio da Alto a Molto Alto / Q.A.S. da Cattiva a Molto Cattiva
Rischio Pericoloso / Q.A.S. Pessima

Considerando la valutazione ambientale parziale, come calcolata dalla equazione n. 12 risultante dalla valutazione del rischio ecologico (ERA, paragrafo 4.2), ogni sito di campionamento è 'colorato' come il giudizio potenziale di rischio corrispondente. La Figura 5.3 ne mostra la mappa cromatica. Nel caso specifico, il giudizio del rischio di tossicità ambientale va da 'basso' a 'moderato' (colore giallo) per i siti di campionamento 1, 7, 11, 14 e 15 con una corrispondente valutazione della qualità delle acque superficiali che va da 'moderata' a 'malsana per i gruppi sensibili'. Il rischio potenziale per i siti di campionamento 2, 4, 5 e 6 invece varia da 'moderato' a 'rilevante' (colore arancione) con qualità delle acque da 'insalubre per i gruppi sensibili' a 'insalubre'.

Cinque siti di campionamento hanno mostrato un rischio potenziale da 'alto' a 'molto alto' con una qualità dell'acqua da 'cattiva' a 'molto cattiva'. Solo il sito di campionamento 8 presenta un rischio ambientale potenziale 'pericoloso' (colore marrone) corrispondente a una qualità 'orribile' dell'acqua. La Figura 5.4 mostra la valutazione del rischio per la salute umana, tenendo conto di tutti gli scenari di esposizione (equazione 13, HRA paragrafo 4.2).

In questo caso, per nove siti di campionamento il potenziale di classificazione del rischio varia da 'trascurabile' a 'molto basso', corrispondente a una valutazione della qualità delle acque superficiali da 'molto buono' a 'buono'.

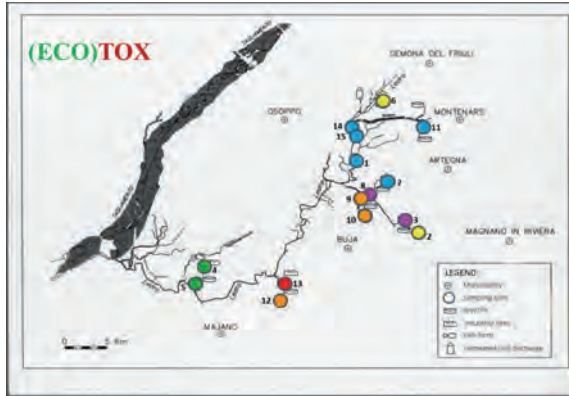
Fig. 5.4. *Mappa cromatica: rischio potenziale per la salute umana e corrispondente qualità delle acque.*



Il rischio per la salute umana è passato da ‘molto basso’ a ‘basso’ per i siti 10 e 12, mentre i siti 6 e 13 hanno presentato un rischio da ‘basso’ a ‘moderato’ con la qualità delle acque superficiali valutata da ‘moderata’ a ‘insalubre per i gruppi sensibili’. I siti di campionamento 3 e 8 mostrano una situazione peggiore (colore rosso e fucsia) rispetto agli altri ma, a differenza del giudizio eco-tossicologico, è il sito 3 ad avere la condizione peggiore.

Secondo la nostra analisi, i contaminanti hanno un effetto più significativo sull’ambiente che sulla salute umana, anche considerando lo scenario di esposizione più estremo (acqua potabile) che ne aumenta notevolmente i livelli di rischio. Nella mappa cromatica raffigurante il rischio potenziale per la salute umana solo quattro siti presentano un rischio da ‘moderato’ ad ‘alto’ mentre la maggior parte dei siti supera la soglia di rischio solo dal punto di vista ecologico.

La valutazione del rischio globale risultante dal calcolo dell’indice IRW tiene conto di entrambe queste prospettive, evitando la perdita di informazioni importanti. La mappa cromatica nella Figura 5.5 mostra una maggiore complessità e quindi un giudizio più accurato sullo stato dell’area indagata. Ad esempio, i siti n. 2 e 9, considerati sicuri dal punto di vista della salute umana, presentano livelli di rischio più elevati: da un rischio potenziale ‘trascurabile’ o ‘molto basso’ a uno ‘moderato’ (nel caso del sito 2) o ‘rilevante’ (nel caso del sito 9) nella valutazione globale del rischio.

Fig. 5.5. *Mappa cromatica: rischio potenziale globale.*

GRA numerical index = IRW/24

Tabella Giudizio di Rischio Potenziale / Qualità delle Acque Superficiali
Rischio da Trascurabile a Molto Basso / Q.A.S. da Molto Buona a Buona
Rischio da Molto Basso a Basso / Q.A.S. da Buona a Moderata
Rischio da Basso a Moderato / Q.A.S. da Moderata a Insalubre per i gruppi sensibili
Rischio da Moderato a Rilevante / Q.A.S. da Insalubre per i gruppi sensibili a Insalubre
Rischio da Rilevante a Molto Rilevante / Q.A.S. da Insalubre a Molto Insalubre
Rischio da Molto Rilevante ad Alto / Q.A.S. da molto Insalubre a Cattiva
Rischio da Alto a Molto Alto / Q.A.S. da Cattiva a Molto Cattiva
Rischio Pericoloso / Q.A.S. Pessima

Anche il sito di campionamento 8 è stato reinterpretato tenendo conto dei peggiori risultati della valutazione eco-tossicologica.

In conclusione, le situazioni peggiori sono state riscontrate nei siti 8, 3 e 13, in ordine decrescente.

La valutazione del rischio globale differenzia i siti 3 e 13 che avevano valori simili nella valutazione eco-tossicologica (punteggio EQc del sito 3, 349; punteggio EQc del sito 13, 341). La differenza tra l'ILCR per l'atenololo, che è $1.65E-05$ nel sito 3 e $3.77E-06$ nel sito 13, è risultata essere importante. Così come per il sito 8, considerando anche gli elevati EQ di claritromicina, ranitidina, furosemide e diazinon, la valutazione del rischio globale si dimostra essere diversa dalla valutazione del rischio umano anche per altri siti.

6. CONCLUSIONI

Dopo la quantificazione di 47 CEC nell'acqua del fiume Ledra, abbiamo calcolato un indice eco-tossicologico e due indici di tossicità umana (effetti cancerogeni e non cancerogeni) per la valutazione di ogni contaminante a partire dalla loro identificazione del pericolo.

Per avere sufficienti dati a nostra disposizione ci siamo avvalsi anche dei metodi *in silico* (modelli QSAR) per completare l'informazione mancante alla ricerca in letteratura. Abbiamo calcolato il valore di riferimento (PNEC) per i 47 composti inclusi prodotti farmaceutici, pesticidi e droghe illecite e quindi abbiamo calcolato un indice eco-tossicologico cumulativo (EQc) per ciascun sito di campionamento. Le predizioni QSAR si sono rivelate particolarmente utili nel caso dei farmaci e delle droghe illecite per le quali i dati eco-tossicologici si sono dimostrati essere gravemente carenti. Per la valutazione del rischio della salute umana, sono stati sviluppati nuovi modelli QSAR per predire i valori mancanti (22) di RfD e SF che hanno completato le informazioni tossicologiche non cancerogene e cancerogene consentendo di calcolare gli indici HQ e ILCR per ciascun sito di campionamento. Combinando le due valutazioni, abbiamo ottenuto i dati necessari per elaborare un metodo globale di valutazione del rischio. I tre indici hanno contribuito a determinare un indice integrato di rischio tossicologico legato alla qualità dell'acqua (IRW). Per ogni sito di campionamento, l'IRW è stato associato a una valutazione del rischio potenziale che tiene conto di tutti e cinque gli scenari di esposizione. L'indice globale IRW utilizzato in questa valutazione fornisce un quadro generale completo della situazione (eco)tossicologica del fiume Ledra, illustrata nelle mappe cromatiche (eco)tossicologiche. Inoltre, individuando e caratterizzando le porzioni critiche di quest'area, l'indice rappresenta un utile strumento per programmare gli interventi futuri in ottica di miglioramento delle reti fognarie interessate.

In questo studio abbiamo introdotto una metodica complessa di valutazione del rischio dei contaminanti nei corpi idrici. Tale valutazione con-

sente di integrare molteplici informazioni, che sono necessarie per giungere alla definizione del rischio sia da un punto di vista ambientale che della salute umana. Servono informazioni sia sulle concentrazioni dei contaminanti, che sui loro effetti. Gli elementi di novità di questo studio sono costituiti dall'uso dei modelli *in silico* a supporto del fatto che spesso vi sono dati mancanti sulle proprietà dei contaminanti. I modelli *in silico* hanno poi consentito di gestire informazioni eterogenee, che sono state integrate per quanto riguarda sia l'indice ambientale che quello tossicologico. Il vantaggio dell'uso dei metodi computerizzati è stato quello di poter integrare in modo numerico parametri multipli, e questo ha consentito di giungere a un ordinamento per rilevanza dei contaminanti a rischio maggiore. Questo strumento consente quindi al gestore di individuare le criticità maggiori, ponendo la dovuta attenzione ad esse. L'indice è quantitativo, e caratterizza i margini di sicurezza, quindi consente di valutare quanto siamo lontani da situazioni critiche.

Essendo uno strumento numerico, consente anche di simulare scenari futuri, al fine di valutare l'efficacia di interventi migliorativi preventivi.

Nel caso specifico, ad esempio, lo studio ha permesso di elencare le sostanze di rilevanza maggiore. Lo strumento è flessibile, trasparente e modulare, per cui si può capire per quale motivo una certa sostanza è a rischio maggiore, se per una proprietà tossicologica o ambientale, ad esempio. Lo studio fornisce uno schema concettuale e al tempo stesso una metodica operativa implementata e funzionante per valutare l'impatto ambientale e sulla popolazione dei contaminanti nei corpi idrici. La metodica consente anche di valutare la bontà di interventi di miglioramento, consentendo l'individuazione puntuale dei contaminanti principali in relazione alle loro concentrazioni.

La metodica ha una valenza generale, pur essendo applicabile a contesti locali ben definiti. Pertanto, in futuro è auspicabile che sia applicata in modo più ampio, per mappare nel territorio tutto la presenza di contaminanti e valutare le località più critiche. La comparazione delle diverse situazioni territoriali consente infatti una gestione più accorta e lungimirante. Individuando analogie e confronti, si possono pianificare interventi mitigatori più efficaci destinando le risorse dove maggiormente si ravvisi la opportunità di intervento.

La metodica è in buona parte computerizzata. I dati sperimentali necessari sono quelli analitici, mentre il confronto e le predizioni potrebbero essere inserite in una piattaforma territoriale gestibile dai soggetti referenti.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Australian Guidelines for Water Recycling (2008). Augmentation of Drinking Water Supplies.
- Backhaus Th., Faust M. (2012). Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.* 46 (5), 2564-2573.
- Bellet V., Hernandez-Raquet G., Dagnino S., Seree L., Pardon P., Bancon-Montiny C., Fenet H., Creusot N., Ait-Aïssa S., Cavailles V., Budzinski H., Antignac J.P., Balaguer P. (2011). Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res.* 46 (6), 1912-1922.
- Bendz D., Paxéus N.A., Ginn T.R. et al. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195-204.
- Benigni R., Bossa C., Netzeva T., Rodomonte A., Tsakovska I. (2007). Mechanistic QSAR of aromatic amines: new models for discriminating between mutagens and nonmutagens, and validation of models for carcinogens. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 754-771.
- Benigni R., Bossa C., Jeliaskova N., Netzeva T., Worth A. (2008). 'The Benigni/Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity – a module of Toxtree' European Commission Report EUR 23241 EN.

- Benigni R., Bossa C., Tcheremenskaia O. (2013). Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts. *Chem. Rev.* 113 (5), 2940-2957.
- Benigni R., C.L. Battistelli, Bossa C., Giuliani A., Fioravanzo E., Basan A., Fuart Gatnik M., Rathman J., Yang C., Tcheremenskaia O. (2019). Evaluation of the applicability of existing (Q)SAR models for predicting the genotoxicity of pesticides and similarity analysis related with genotoxicity of pesticides for facilitating of grouping and read across. EFSA supporting publication 2019: 16(3): EN-1598. 220 pp. doi: 10.2903/sp.efsa.2019.EN-1598.
- Boriani E., Mariani A., Baderna D., Moretti C., Lodi M., Benfenati E. (2010). ERICA: a multiparametric toxicological risk index for the assessment of environmental healthiness. *Environ. Int.* 36, 665-674.
- Boriani E., Benfenati E., Baderna D., Thomsen M. (January 2013). Application of ERICA index to evaluation of soil ecosystem health according to sustainability threshold for chemical impact. *Sci. Total Environ.* 443, 134-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.025>.
- Cassano A., Raitano G., Mombelli E., Fernández A., Cester J., Roncaglioni A., Benfenati E. (2014). Evaluation of QSAR models for the prediction of ames genotoxicity: a retrospective exercise on the chemical substances registered under the EU REACH regulation. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 32 (3), 273-298. <http://dx.doi.org/10.1080/10590501.2014.938955>.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E. (2005 Oct 28). A multi-residue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewater. *J. Chromatogr. A* 1092 (2), 206-215.
- Castiglioni S., Zuccato E., Crisci E., Chiabrando C., Fanelli R., Bagnati R. (2006). Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography – tandem

mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78 (24), 8421-8429. (Publication Date (Web): November 17, 2006). <https://doi.org/10.1021/ac061095b>.

- Chang H., Wan Y., Wu S., Fan Z., Hu J. (2011). Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res.* 45 (2), 732-740.
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185-194.
- Commission Implementing Decision (EU), 2015. 495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2015.078.01.0040.01.ENG.
- Czech B., Joško I., Oleszczuk P. (2014 Jun.). Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 247-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.024>. (Epub 2014 Apr. 15).
- Direttiva (2000). 60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32000L0060>.
- Direttiva (2008). 105/ec of the european parliament and of the council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing council directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:en:PDF>.
- Direttiva (2013). 39/EC of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 2000/60/EC and

2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32013L0039>.

- Dorevitch S., Panthi S., Huang Y., Li H., Michalek A.M., Pratap P., Wroblewski M., Liu L., Scheff P.A., Li A. (2011). Water ingestion during water recreation. *Water Res.* 45, 2020-2028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.12.006>.
- EFSA report: guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. <https://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/3290>.
- Enault J., Robert S., Schlosser O., de Thé C., Loret J.F. (2015 Nov.). Drinking water, diet, indoor air: Comparison of the contribution to environmental micropollutants exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218 (8), 723-730. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.06.001>. (Epub 2015 Jun. 8).
- European Commission State of the Art Report on Mixture Toxicity Final Report Executive Summary 22 December 2009.
- European Community, Regulation No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council, of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission.
- European Commission Brussels 31.5.2012 COM(2012) 252 final communication from the commission to the council the combination effects of chemicals chemical mixtures. <http://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2012/EN/1-2012-252-EN-F1-1.Pdf>.
- European Communities, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances Commission Regulation (EC) no 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances Directive

98/8/EC of the European Parliament and of the Council Concerning the Placing of Biocidal Products on the Market. Part II, Chapter 3. https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2_2ed_en.pdf.

- Fenet H., Mathieu O., Mahjoub O., Li Z., Hillaire-Buys D., Casellas C., Gomez E. (2012 Jun.). Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere* 88 (1), 49-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.050>. (Epub 2012 Mar 21).
- Fent K., Weston A.A., Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.
- Ferrari B., Paxéus N., Giudice R.L., Pollio A., Garrica J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359-370.
- Fjodorova N., Novich M., Vrachko N. et al. (2008). Directions in QSAR modeling for regulatory uses in OECD member countries, EU and in Russia. *J. Environ. Sci. Health C* 26, 201-236.
- Fjodorova N., Vračko M., Novič M., Roncaglioni A., Benfenati E. (2010). New public QSAR model for carcinogenicity. *Chem. Cent. J.* 4 (Suppl 1), S3.
- Friedman J., Hastie T., Tibshirani R. (2010). Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. *J. Stat. Softw.* 33 (1), 1-22. <http://www.jstatsoft.org/v33/i01/>.
- Government of Canada, s.d., Federal Contaminated Site Risk Assessment in Canada, Part I: Guidance on Human Health Preliminary Quantitative Risk Assessment (PQRA) (Version 2.0. ISBN: 978-1-100-17671-0).
- Greco W., Unkelbach H.D., Pösch G., Suhnel J., Kundi M., Bodeker W. (1992). Consensus on concepts and terminology for combined-action

assessment: the Saariselk agreement. *Arch. Complex Environm. Stud.* 4 (3), 65-72.

- Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.6: QSARs and grouping of chemicals. https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r6_en.pdf/77f49f81-b76d-40ab-8513-4f3a533b6ac9.
- Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance. https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf/e4a2a18f-a2bd-4a04-ac6d-0ea425b2567f.
- Haranczyk M., Holliday J. (2008). Comparison of similarity coefficients for clustering and compound selection. *J. Chem. Inf. Model.* 48, 498-508. <http://dx.doi.org/10.1021/ci700413a>.
- Ho W.L., Jin L., Si W., Tsui M.M.P., Zhou B., Jiao L., Cheung P.C., Chun Y.K., Murphy M.B., Lam P.K.S. (July 2013). Pharmaceuticals in tap water: Human health risk assessment and proposed monitoring framework in China. *Environ. Health Perspect.* 7, 121.
- http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf.
- <http://sarpy.sourceforge.net/index.php>.
- <http://toxtree.sourceforge.net>.
- http://www.talete.mi.it/products/dragon_description.htm.
- <http://www.vega-qsar.eu/>.
- <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugreg/61824/PDF/default/statugreg.pdf>.

- <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugscore/61828/PDF/default/statugscore.pdf>.
- <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>.
- <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface>.
- https://www3.epa.gov/airnow/aqi_brochure_02_14.pdf.
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A. et al. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* 346, 87-98.
- Jones R.M., Stayner L.T., Demirtas H. (2014 Oct.). Multiple imputation for assessment of exposures to drinking water contaminants: evaluation with the Atrazine Monitoring Program. *Environ. Res.* 134, 466-473. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.027>. (Epub 2014 Oct 29).
- JRC technical reports – water framework directive watch list method (2016). EUR 27813 EN. <https://ec.europa.eu/jrc/en/news/first-watch-list-emerging-water-pollutants>.
- Kim Y., Choi K., Jung J. et al. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ. Int.* 33, 275-370.
- Kim P.G., Park Y., Ji K., Seo J., Lee S., Choi K., Kho Y., Park J., Choi K. (2012). Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere* 89, 10-18.
- Mombelli E., Ringeissen S. (2009). The computational prediction of toxicological effects in regulatory contexts. *L'Actual. Chim.* 335, 52-59.

- OECD (1992). Test no. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en>.
- OECD (2004). Test no. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069947-en>.
- OECD (2011). Test no. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069923-en>.
- OECD (2012). Test no. 211: Daphnia magna Reproduction Test. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185203-en>.
- OECD (2013). Test no. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264203785-en>.
- OECD (2014). Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models, OECD Series on Testing and Assessment, No. 69, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264085442-en>.
- Pawlowski S., van Aerle R., Tyler C.R. et al. (2004). Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 330-345.
- Pharmaceuticals in the environment. <https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/our-company/Sustainability/Atenolol.pdf>.
- Pieri V., Vandekerckhove J., Goi D. (2012). Ostracoda (Crustacea) as indicators for surface water quality: a case study from the Ledra River basin (NE Italy). Published online: 16 December 2010 Springer Science+Business Media B.V. 2010. *Hydrobiologia* 688, 25-35. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-010-0568-1>.
- Ribeiro A.R., Pedrosa M., Moreira N.F., Pereira M.F., Silva A.M. (2015 Oct. 30). Environmental friendly method for urban wastewater monitoring of micropollutants defined in the Directive 2013/39/EU and

Decision 2015/495/EU. *J. Chromatogr. A* 1418, 140-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.057>. (Epub 2015 Sep 21).

- Riva F., Zuccato E., Castiglioni S. (2015 Mar. 15). Prioritization and analysis of pharmaceuticals for human use contaminating the aquatic ecosystem in Italy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 71-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.003>. (Epub 2014 Oct. 14).
- Schets F.M., Schijven J.F., de Roda Husman A.M. (2011). Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Res.* 45, 2392-2400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.025>.
- Segura P.A., Francois M., Gagnon C., Sauvé S. (2009). Review of the occurrence of antiinfectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ. Health Perspect.* 117, 675-684.
- Snyder S.A., Trenholm R.A., Snyder E.M., Bruce G.M., Pleus R.C., Hemming J.D.C. (2008). Toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in drinking water. Awwa Research Foundation, USA.
- Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Drinking Water (2008). AWWA Research Foundation (Ed.).
- US EPA (1993). Reference dose (RfD): description and use in health risk assessments background document 1A March 15, 1993. <https://www.epa.gov/iris/referencedose-rfd-description-and-use-health-risk-assessments#1.2.1>.
- US EPA (2005). Guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/630/P-03/001F. In: Risk Assessment Forum.
- US EPA (2011). Exposure factors handbook: 2011 edition. In: Chapter 3 – Ingestion of Water and Other Select Liquids. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC EPA/600/R-09/052F. Available from the National Technical Information Service, Springfield, VA, and online at. <http://www.epa.gov/ncea/efh>.

- Watts C., Maycock D., Crane M., Fawell J., Goslan E. (s.d.) Desk based review of current knowledge on pharmaceuticals in drinking water and estimation of potential levels (Defra Project Code: CSA 7184/WT02046/DWI70/2/213) Final Report.
- Winter M.J., Lillicrap A.D., Caunter J.E. et al. (2008). Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 86, 361-369.
- Zhang Y., Geißen S.-U., Gal C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151-1161.

PUBBLICAZIONI RELATIVE AL PROGETTO UNIUD-AUSIR

- Raitano G., Goi D., Pieri V., Passoni A., Mattiussi M., Lutman A., Romeo I., Manganaro A., Marzo M., Porta N., Baderna D., Colombo A., Aneggi E., Natolino F., Lodi M., Bagnati R., Benfenati E. (2018). (Eco)toxicological maps: A new risk assessment method integrating traditional and in silico tools and its application in the Ledra River (Italy), *Environment International*, Volume 119, Pages 275-286, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.035> (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412018307797>).

I Quaderni AUSIR, nati da una convergenza di idee di Massimo Canali, Marcello Del Ben, Daniele Goi e Lorenzo Tosolini, rappresentano una forma di divulgazione dei lavori realizzati in collaborazione tra l'Università degli Studi di Udine e l'Autorità Unica per i Servizi Idrici e i Rifiuti della Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, sui temi della risorsa acqua e dei rifiuti. Essi riportano attività di innovazione e ricerca su tematiche relative a: captazione (A), trattamento-distribuzione (B), utilizzo-scarico (C), depurazione (D), recupero-reimmissione in ambiente (E) della risorsa idrica. Vi sono compresi anche altri temi come: la comunicazione (ç), gli aspetti economico-giuridici (€) e di gestione (@) relativi all'articolato mondo dell'acqua, dei rifiuti e non solo.

I contributi includono vari livelli di impegno: parti dei lavori di tesi degli studenti di vari corsi di laurea, sintesi descrittive di risultati ottenuti in borse di ricerca, relazioni di assegni di ricerca annuali o pluriennali, studi svolti in percorsi di dottorato di ricerca, descrizioni dei risultati raggiunti in ricerche approfondite e pubblicate in giornali dedicati di livello nazionale e internazionale.

Giuseppa Raitano, laureata in Tossicologia dell'Ambiente all'Università degli Studi di Milano, collabora come ricercatrice nel Laboratorio di Chimica e Tossicologia Ambientale presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRCSS), Milano.

Emilio Benfenati è capo del Dipartimento di Ambiente e Salute presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRCSS), Milano.

