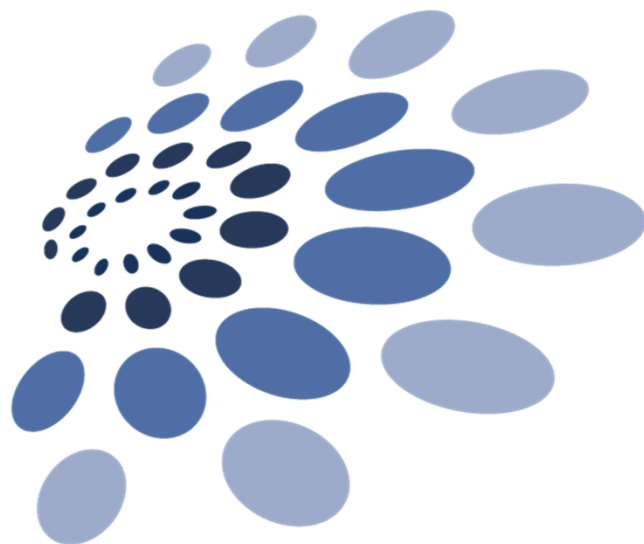




Università degli Studi di Trieste

Corsi di Studio

SAMAC (fondamentale)

ECG (a scelta dello studente)

Previsione dell'esposizione e stima del rischio

- ❖ Pericolo e rischio
- ❖ Classificazione CLP
- ❖ PEC e PNEC
- ❖ Modello di MacKay e di Hansch (QSARs)
- ❖ Regolamento REACH
- ❖ Sediqua[®]

ECOTOSSICOLOGIA

Prof. Monia Renzi (BIO/07)

mrenzi@units.it

III anno – I Semestre

Pericolo vs Rischio

Pericolo

Caratteristica intrinseca della sostanza.

Rischio

Probabilità di andare incontro agli effetti avversi che la sostanza può provocare, in seguito ad esposizione.

In ecotossicologia il rischio è la stima degli effetti di un agente chimico sulla salute degli organismi viventi nonché sui beni naturali e sulla qualità di vita della popolazione

Pericolo e rischio sono definiti anche dalla art. 2, lettera r e lettera s del D.Lgs. 81/08



CLP e REACH

Classification, Labelling and Packaging (CLP, CE n. 1272/2008, in vigore dal 20/01/09) allinea la precedente legislazione UE al GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche).

Ha introdotto un nuovo sistema di **classificazione**, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele pericolose e armonizza i criteri di classificazione incorporando le regole ONU.



Il **CLP** è **complementare con il REACH (CE, 1907/06 del 18/12/06)**, il regolamento sulla registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*).

Il REACH istituisce l'**ECHA** (Agenzia Europea delle sostanze Chimiche).

Lo scopo principale del regolamento è quello di migliorare la conoscenza dei pericoli e dei rischi derivanti da sostanze chimiche già esistenti (introdotte sul mercato prima del settembre 1981) e nuove (dopo il settembre 1981) e al contempo mantenere e rafforzare la competitività e le capacità innovative dell'industria chimica europea.

Valutazione della Sicurezza Chimica

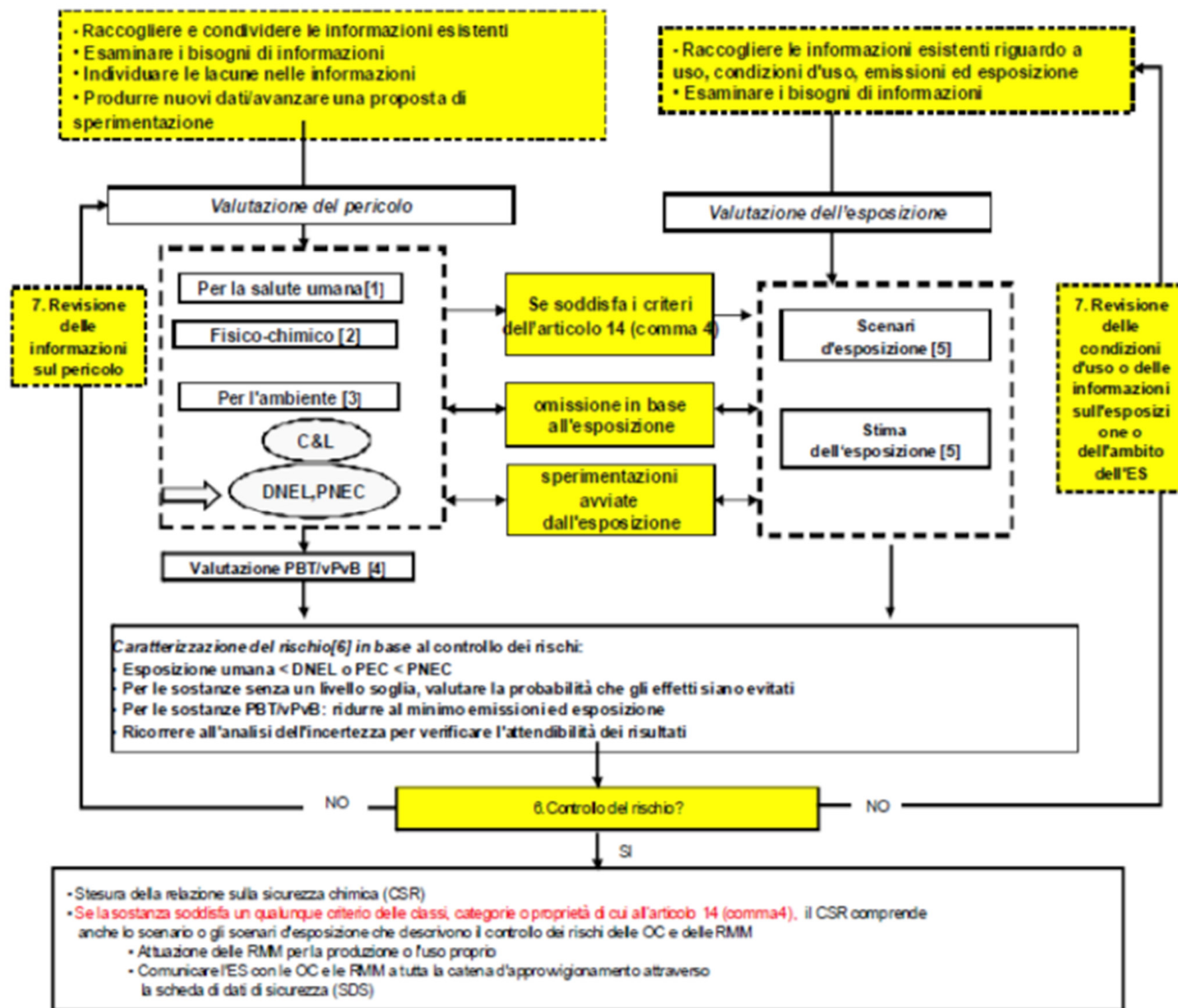
CSA Chemical Safety Assessment

Il processo di CSA consiste in:

- *Valutazione dei pericoli*

*Se la sostanza soddisfa i criteri come sostanza pericolosa a norma del regolamento CLP (reg. CE n.1272/2008) o i criteri di sostanza **PBT** (Persistenti, Bioaccumulabili e Tossiche) o **vPvB** (molto Persistenti e molto Bioaccumulabili) è necessario prevedere le due fasi successive per pervenire alla valutazione del rischio:*

- *Valutazione dell'esposizione*
- *Caratterizzazione del rischio*

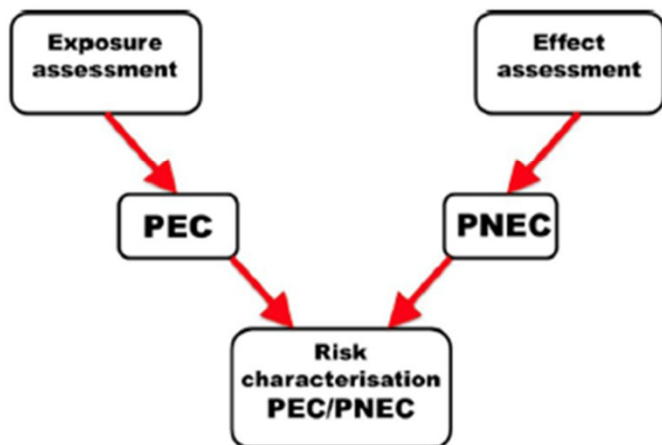


...dal risk assessment semplificato...

Exposure assessment

Effect assessment

```
graph TD; A[...dal risk assessment semplificato...] --> B[Exposure assessment]; A --> C[Effect assessment];
```



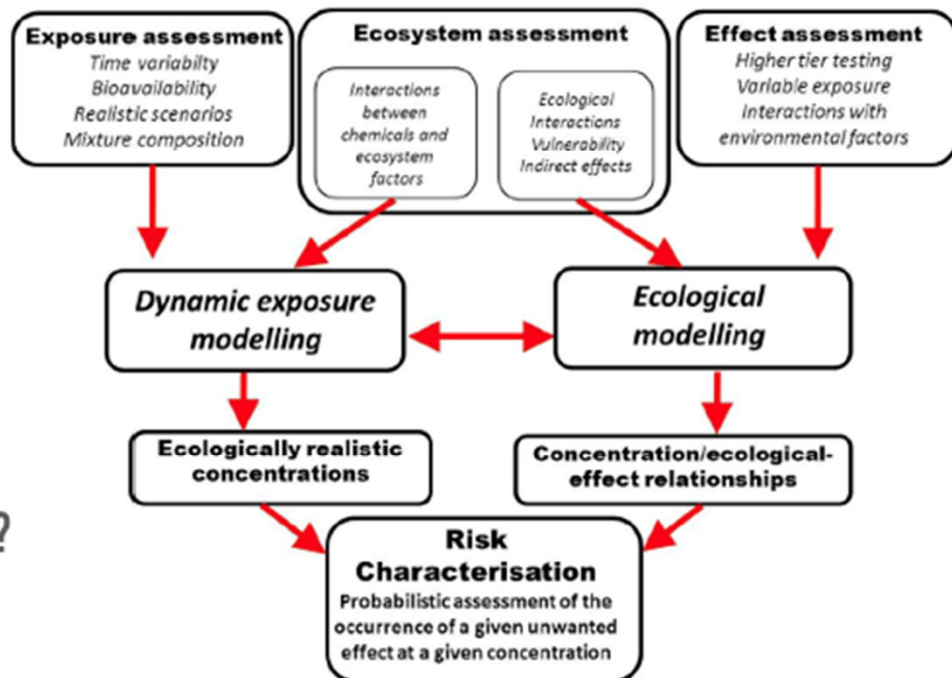
... per rispondere a quesiti di interesse
ecologico quali ...

A seguito dell'esposizione ad una
perturbazione chimica:

A seguito dell'esposizione ad una perturbazione chimica:

- 🕒 **Quale è la probabilità di perdere una popolazione?**
- 🕒 **Quanto varierà la biodiversità?**
- 🕒 **La produttività subirà variazioni?**
- 🕒 **La struttura della rete trofica è protetta?**

... al risk assessment basato su valutazioni ecotossicologiche integrate ad aspetti ecologici



PEC (Predicted Environmental Concentration)

Permette di valutare l' esposizione; richiede la conoscenza di:

- Proprietà fisico-chimiche della sostanza (solubilità in acqua, tensione di vapore, coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, costante di Henry ecc.);
- “Proprietà ambientali”, intendendo per proprietà ambientali le proprietà partitive e la resistenza delle sostanze ai processi di degradazione nei diversi comparti.

La determinazione della PEC costituisce, il passo conclusivo della fase di valutazione dell'esposizione.

Per la determinazione delle PEC si ricorre all'uso di **modelli di calcolo** che permettono di trattare un numero consistente di dati riguardanti le proprietà fisico-chimiche e ambientali della molecola, le quantità e le modalità di impiego del prodotto, le caratteristiche degli scenari ambientali interessati e i fenomeni di deriva.

Rischio Ecotossicologico

Il rischio ecotossicologico è valutato in base al:

- **TER** (Toxicity Exposure Ratio) = tossicità / PEC

dove tossicità è riferita ad un determinato organismo non bersaglio e la PEC è la concentrazione prevista nel comparto ambientale riferito all'organismo considerato.

- il rischio ecotossicologico per l'organismo non bersaglio è considerato accettabile se il valore dell'esposizione (PEC) è più basso del valore della tossicità di una quantità superiore o pari al fattore di sicurezza (TER superiore o uguale al fattore di sicurezza).
- il “fattore di sicurezza” varia da 1 a 100 a seconda della incertezza legata alla affidabilità degli studi di tossicità (in condizioni di laboratorio o più vicine a quelle naturali) e al fatto che gli studi di tossicità siano condotti su un limitato numero di specie animali indicatrici (selezionate sulla base della facilità di allevamento, di una stabile sensibilità agli effetti tossici ecc.).
- L'obiettivo dell'uso del fattore di sicurezza è quello di proteggere l'insieme delle specie animali esistenti.

Se dal calcolo il TER risulta avere un valore inferiore al fattore di sicurezza allora si è in presenza di un rischio non accettabile per l'organismo non bersaglio considerato.

È possibile ridurre il rischio e riportarlo a valori accettabili attraverso l'adozione di “misure di mitigazione del rischio”.

Calcolo della PEC per molecole MWWTPs

Ad esempio la PEC per una molecola antibiotica

$$PEC_w = \frac{A * (100-R)}{365 * P * V * D * 100}$$

A = consumo annuo della sostanza in kg/a

R = rimozione in %

P = numero di abitanti

V = volume di acque reflue pro capite (0,2 m3)

D = fattore di diluizione in ambiente (default = 10)

PNEC (Predicted No Effect Concentration)

Pochi dati

(acuti e/o cronici)



Approccio deterministico



EC50 o NOEC (più basso)

e

Fattori di valutazione (AF)



$$\text{PNEC} = \text{EC50/NOEC} : \text{AF}$$

Molti dati

(≥ 10 NOEC relativi a ≥ 8 taxa*)



Approccio probabilistico



HC5

e

Fattori di valutazione (AF)



$$\text{PNEC} = \text{HC5} : \text{AF}$$

* *Comparto acqua dolce*

TABELLA 1 – TIPOLOGIA DI BERSAGLIO E DI PNEC IN FUNZIONE DEL COMPARTO AMBIENTALE (ECHA, 2011)

BERSAGLIO	COMPARTO AMBIENTALE IN CUI AVVIENE L'ESPOSIZIONE (PEC)	CONCENTRAZIONE PREVEDIBILE PRIVA DI EFFETTI (PNEC)
Suolo e acque interne		
organismi acquatici	acque superficiali	$PNEC_{water}$
organismi bentonici	sedimenti	$PNEC_{sed}$
organismi terrestri	suolo agricolo	$PNEC_{soil}$
predatori che si nutrono di pesci	pesci	$PNEC_{oral}$ da $NOAEL_{uccelli/mammiferi}$
predatori che si nutrono di lombrichi	lombrichi	$PNEC_{oral}$ da $NOAEL_{uccelli/mammiferi}$
microorganismi	impianti di trattamento acque reflue	$PNEC_{microorganismi}$
Acque marine		
organismi acquatici	acqua marina	$PNEC_{water}$
organismi bentonici	sedimenti marini	$PNEC_{marine\ sed}$
predatori che si nutrono di pesci	pesci	$PNEC_{oral}$ predators
predatori posti ai vertici della catena alimentare	predatori che si nutrono di pesci	$PNEC_{oral}$ top predators

Assessment Factor-AF

PNEC acqua dolce – Approccio deterministico

Dati disponibili (minimi)	AF *
L(E)C50 a breve termine per ognuno di 3 livelli trofici (pesce, invertebrati – Daphnia e alghe)	1000
EC10/NOEC a lungo termine per un livello trofico (più sensibile, pesce o Daphnia)	100
EC10/ NOEC a lungo termine per 2 livelli trofici (specie più sensibile, pesce e/o Daphnia e/o alghe)	50
EC10/ NOEC a lungo termine per 3 livelli trofici (in genere, pesce, Daphnia e alghe)	10
Dati di campo o da ecosistemi modello (microcosmi, mesocosmi)	Caso specifico

AF: Il fattore di valutazione esprime l'incertezza nell'estrapolazione di risultati sugli effetti per l'ecosistema da dati sperimentali:

- Variabilità dati di tossicità intra/inter laboratori
- Variabilità biologica intra/inter specie
- Derivazione dei valori di tossicità cronica e acuta
- Estrapolazione dell'impatto sull'ambiente da dati di laboratorio

Stima del rischio

$$R = \frac{PEC}{PNEC}$$

PEC : massime concentrazioni ambientali negli effluenti (PECeffl) e acque di superficie (PECsup) ottenute dalla letteratura

PNEC : concentrazione che non dà effetto tossico



$$R \geq 1$$



**rischio
ambientale**

Conclusions under the current Directive are:

1. $PEC / PNEC < 1$ = No immediate concern
2. $PEC / PNEC 1 - 10$ = Of concern if supply volumes increase
3. $PEC / PNEC 10 - 100$ = Further data required
4. $PEC / PNEC > 100$ = Reduce risk immediately

Stima del rischio

$$R = \frac{MEC}{PNEC}$$

MEC : massime concentrazioni ambientali negli effluenti (MECeffl) e acque di superficie (MECsup) ottenute dalla letteratura

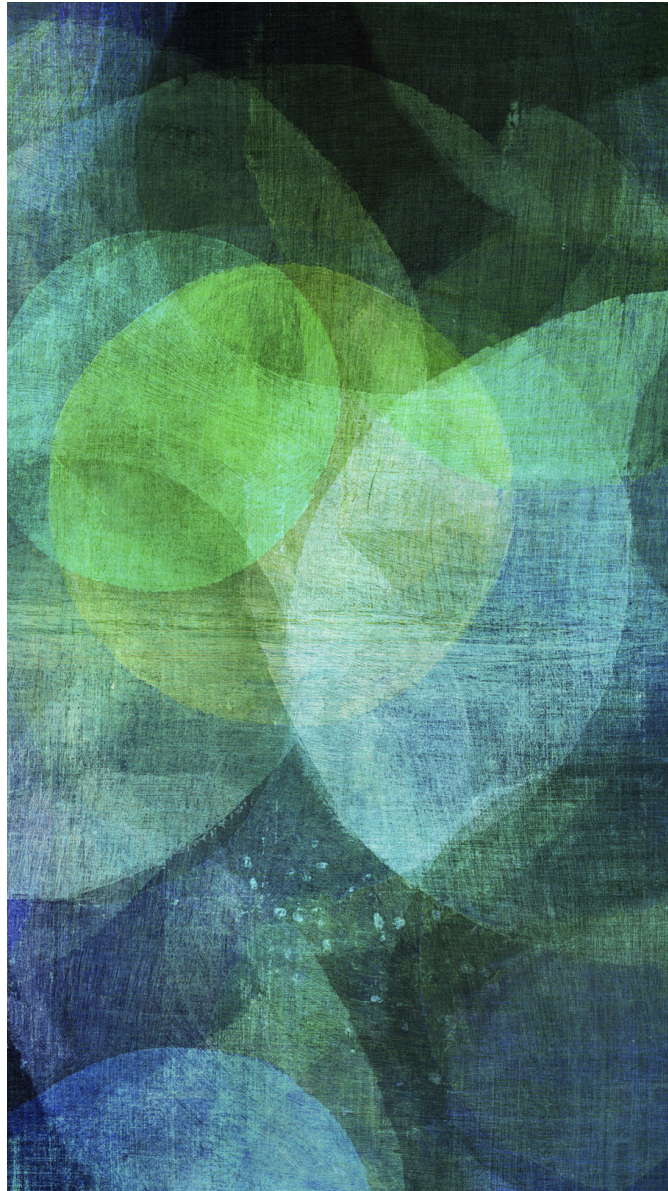
PNEC : concentrazione che non dà effetto tossico



$$R \geq 1$$



rischio
ambientale



DOMANDE??

L.P. Hammett: 1935

**Similar changes in structure produce
similar changes in reactivity**

SAR & QSAR

SAR (Structure-Activity Relationship)

Relazione esistente fra la struttura tridimensionale di una molecola e la sua bioattività.

L'analisi della SAR permette di determinare i gruppi chimici che inducono un dato effetto su un organismo target.

La SAR permette di modificare l'effetto o la potenza di un composto bioattivo (spesso un farmaco) variando la sua struttura chimica.

Il paradosso SAR si riferisce al fatto che non è necessariamente vero che tutte le molecole simili hanno attività simili.



Questo metodo è stato ottimizzato per costruire relazioni matematiche tra la struttura chimica e l'attività biologica, noto come Relazione Quantitativa Struttura-Attività (QSAR).

Applicazione dei modelli (Q)SAR

I modelli di relazione struttura-attività (SAR) e di relazione quantitativa struttura-attività (QSAR) - collettivamente chiamati (Q)SAR - sono modelli matematici utilizzati per desumere le proprietà fisico-chimiche, biologiche e relative al destino nell'ambiente dei composti, in base alla loro struttura chimica nota.

Questi modelli sono disponibili gratuitamente o possono essere acquistati come software commerciale.

L'uso dei modelli (Q)SAR ha prodotto informazioni attendibili che sono paragonabili e sufficienti ad adempiere alle prescrizioni in materia di informazione.

Il (Q)SAR deve essere validato scientificamente, e la sostanza in questione deve rientrare nel campo di applicabilità del modello.

QSAR (Quantity Structure-Activity Relationship)

Si basa sull'assunzione che molecole di simile struttura abbiano attività biologica simile.

Le forme delle relazioni matematiche che si possono elaborare variano a seconda della specifica proprietà bersaglio che si vuol tentare di descrivere/prevedere e del set di descrittori della struttura chimica che si sono scelti, ma possono comunque tutte essere ricondotte alla forma generale:

$$f(\text{risposta biologica}) = f(\text{proprietà elettroniche, steriche, lipofiliche})$$

Assunzioni principali, del modello QSAR:

1. le proprietà di una sostanza chimica sono derivabili dalla sua struttura molecolare
2. la struttura molecolare può essere rappresentata da un set numerico (descrittori espliciti o altre rappresentazioni numeriche)
3. composti di struttura simile presentano attività simile
4. composti di struttura diversa presentano attività diversa

QSAR ha quindi bisogno di relazioni continue e regolari. In uno spazio ristretto di descrittori o con un training set di composti dello stesso genere le assunzioni di similarità sono fondate. Ma con composti di vario genere, o esplorando valori poco rappresentati nel dataset, o nel caso di attività/proprietà dalla dipendenza sconosciuta c'è il rischio di uscire dal dominio di regolarità.

Limiti dell'approccio QSAR (Quantity Structure-Activity Relationship)

L'assunzione che l'attività/proprietà (specialmente l'attività biologica) di un composto sia derivabile dalla struttura del composto stesso trascura esplicitamente ogni interazione con l'ambiente. Nel caso di interazioni deboli, o poco incidenti sull'attività, l'assunzione è legittima.

Molte interazioni sono tuttavia complesse o sconosciute, e potrebbero determinare degli effetti non trascurabili, specie sull'attività biologica. Questa complessità ha portato alla stesura di metodologie diverse che riflettono il grado di accuratezza richiesto, da confronti numerici “euristici” fino a modelli meccanicistici.

Per quanto possa essere utile, questa assunzione richiede un certo grado di cautela per non portare a risultati sbagliati. Se il set è incompleto, o contiene parametri devianti, molecole con attività/proprietà diverse potrebbero essere descritte dagli stessi valori.

Nelle ultime due assunzioni è implicito il concetto di “similarità” chimica. Due molecole sono simili se i valori numerici dei loro descrittori cadono dentro un determinato intervallo.

Ma vista la grande varietà di relazioni funzionali tra attività e descrittore (lineare, logaritmica, esponenziale...) le differenze hanno pesi diversi.

Ad esempio, nel caso di relazioni logaritmiche o paraboliche, una piccola differenza può portare a risultati molto diversi. In pratica, le assunzioni sono valide principalmente per alcune relazioni semplici (e.g. Lineari).

Esempio applicativo: caso di studio QSAR su liquidi ionici

Chemical Engineering Journal 175 (2011) 17–23



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cej

Chemical
Engineering
Journal

Theoretical descriptor for the correlation of aquatic toxicity of ionic liquids by quantitative structure–toxicity relationships

S. Bruzzone^{a,*}, C. Chiappe^a, S.E. Focardi^b, C. Pretti^c, M. Renzi^d

^a Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa, Via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy

^b Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena, Via Mattioli 4, 53100 Siena, Italy

^c Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa, Viale delle Piagge 2, 56127 Pisa, Italy

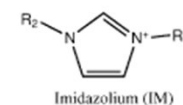
^d Centro Ricerche di Ecologia Lagunare Pesca ed Acquacoltura, Polo Universitario Grossetano, via lungolago dei pescatori sn, Orbetello, GR, Italy

Lo studio ha relazionato i risultati sperimentali relativi all'esposizione del *V. fischeri* con i modelli calcolati applicando il metodo QSAR mediante software CODESSA.

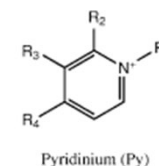
Tutti i descrittori utilizzati sono calcolati solo dalle strutture delle molecole, il che consente di prevedere IL non disponibili o sconosciuti, in fase gassosa e in acqua.

Nei IL testati, appartenenti a molte famiglie di IL, i cationi sono sempre accompagnati da un anione alogenuro (Cl o Br).

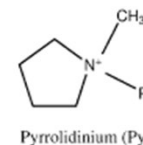
S. Bruzzone et al. / Chemical Engineering Journal 175 (2011) 17–23



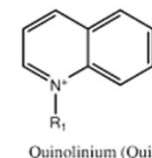
$R_1 = -C_2H_5; -C_3H_7; -C_4H_9; -C_5H_{11}; -C_6H_{13}; -C_7H_{15}; -C_8H_{17}; -C_{10}H_{21}; -CH_2CH_2OCH_3; -CH_2CH_2OCH_2CH_3; -CH_2CH_2OH; -CH_2CH(OH)CH_2OH$
 $R_2 = -CH_3; -C_4H_9; -C_8H_{17}$



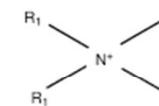
$R_1 = H; -C_3H_7; C_5H_{11}; -C_4H_9; -C_6H_{13}; -C_8H_{17}$
 $R_2 = -CH_3$
 $R_3 = -CH_3$
 $R_4 = -CH_3; -N(CH_3)_2$



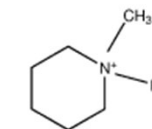
$R_1 = -C_4H_9; -C_6H_{13}; -C_8H_{17}$



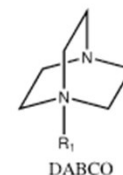
$R_1 = -C_4H_9; -C_8H_{17}$



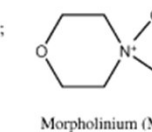
$R_1 = -C_2H_5$
 $R_2 = -C_2H_5$
 $R_3 = -C_2H_5$
 $R_4 = -C_6H_{13}$



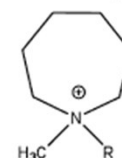
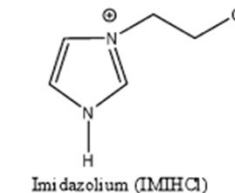
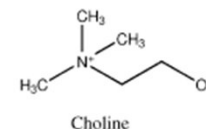
$R_1 = C_4H_9$



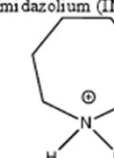
$R_1 = -C_2H_5; -C_4H_9; -C_6H_{13}; -C_8H_{17}; -C_{10}H_{21}$



$R_1 = -C_2H_5; -C_4H_9; -C_6H_{13}; -C_8H_{17}; -C_{10}H_{21}; -CH_2CH(OH)CH_2OH$



$R = -C_5H_{11}; -C_7H_{15}$



$R = -C_4H_9; -C_6H_{13}$

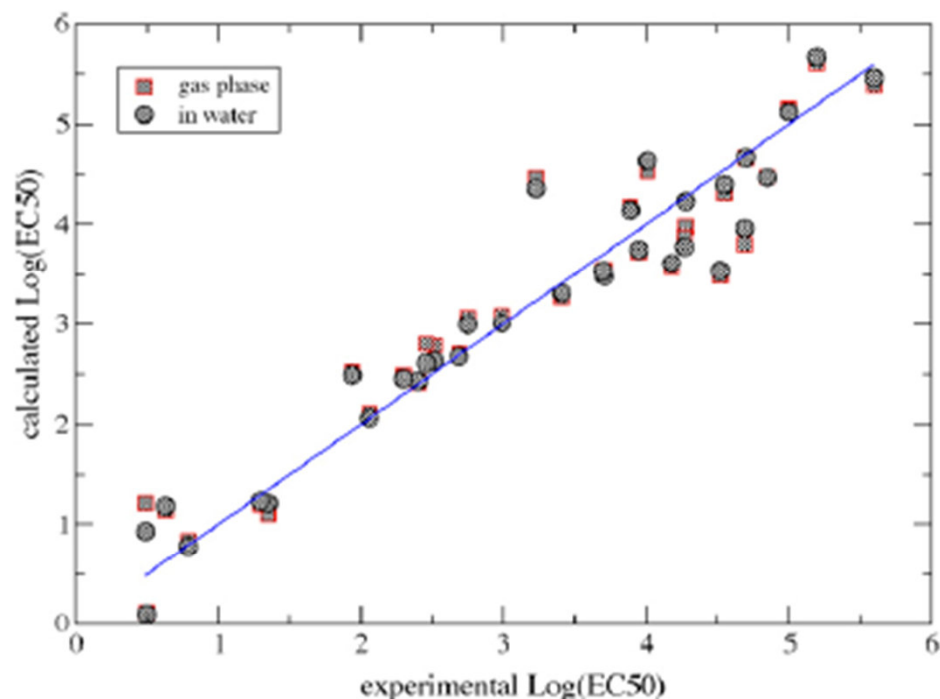


Fig. 4. Calculated versus experimental $\text{Log}_{10}\text{EC}_{50}$ in the four descriptors models. Descriptors calculated in gas phase (squares) and in water (circles).

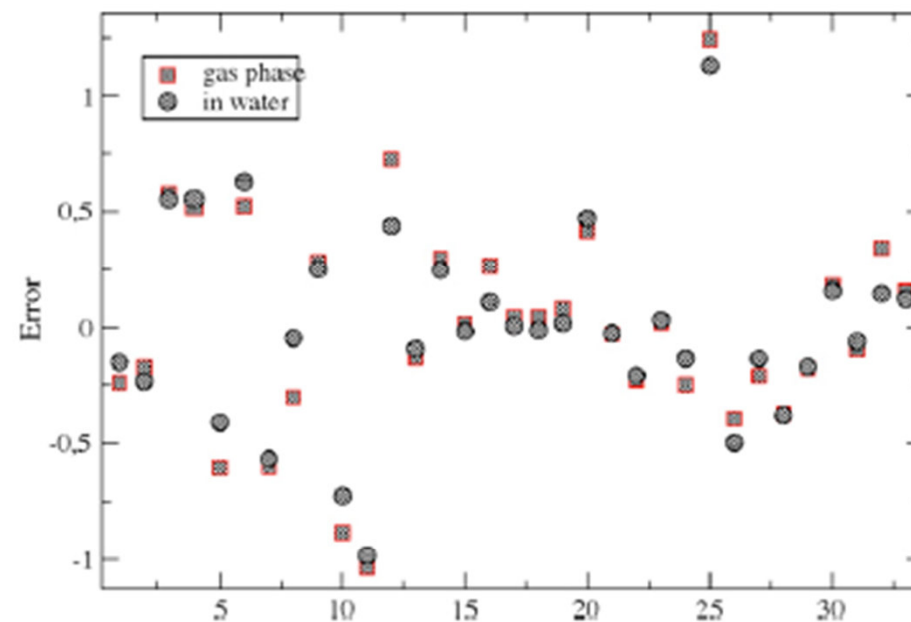
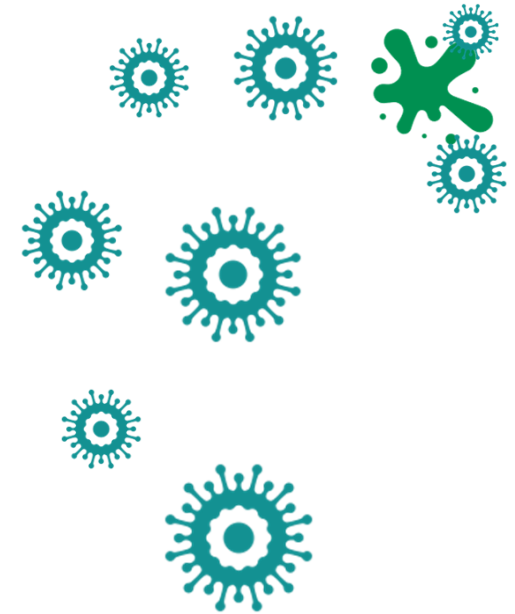


Fig. 5. Differences between $\text{Log}_{10}\text{EC}_{50}$ calculated by QSPR analysis according to correlation 4 and $\text{Log}_{10}\text{EC}_{50}$ experimental as reported in Table 4. Descriptors calculated in gas phase (squares) and in water (circles). In abscissa, the compound identity number is reported.

È stata trovata una correlazione a quattro parametri per una classe di liquidi ionici a base di alogenuri.

Per entrambi i casi sono state riscontrate correlazioni soddisfacenti con i dati sperimentali ma l'impiego di descrittori calcolati in solvente garantisce una migliore correlazione e una maggiore affidabilità di previsione rispetto a quelli calcolati nella fase gassosa.



DOMANDE?