BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO

AÑO CCCXXXV • LUNES 5 DE JUNIO DE 1995 • SUPLEMENTO DEL NUM. 133

ESTE NUMERO CONSTA DE CINCO FASCICULOS

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

REAL DECRETO 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas.

REGLAMENTO

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

REGLAMENTO SOBRE NOTIFICACION DE SUSTANCIAS NUEVAS Y CLASIFICACION, ENVASADO Y ETIQUETADO DE SUSTANCIAS PELIGROSAS

CAPITULO I

Ambito de aplicación y definiciones

Artículo 1. *Ambito de aplicación.*

1. El presente Reglamento regula:

a) La notificación de las sustancias.
b) El intercambio de información sobre sustancias notificadas.
c) La evaluación de los posibles riesgos que suponen las sustancias notificadas para el hombre y el medio ambiente.
d) La clasificación, el envasado y el etiquetado de sustancias peligrosas para el hombre y el medio ambiente.

Todo ello, cuando dichas sustancias se comercialicen en el mercado interior.

2. Se excluyen del ámbito de aplicación del presente Reglamento las siguientes sustancias y preparados en estado acabado, destinados al usuario final, que son regulados por sus reglamentaciones específicas:

a) Los medicamentos de uso humano y veterinario.
b) Los cosméticos.
c) Las mezclas de sustancias en forma de residuos.
d) Los productos alimenticios.
e) Los alimentos para animales.
f) Los plaguicidas.
g) Las sustancias radiactivas.
h) Otras sustancias o preparados para los que ya existan procedimientos de notificación y cuyos requisitos sean equivalentes a los dispuestos en el presente Reglamento.

Asimismo, se excluyen del ámbito de aplicación del presente Reglamento:

i) El transporte de mercancías peligrosas por ferrocarril, carretera o vía de navegación interior, marítima o aérea.
j) Las sustancias en tránsito sometidas a control aduanero, siempre que no sean objeto de tratamiento o transformación.

Artículo 2. *Definiciones.*

1. A efectos del presente Reglamento se entiende por:

a) Sustancias: los elementos químicos y sus compuestos en estado natural, o los obtenidos mediante cualquier procedimiento de producción, incluidos los aditivos necesarios para conservar la estabilidad del producto y las impurezas que resulten del procedimiento utilizado, excluidos los disolventes que puedan separarse sin afectar la estabilidad ni modificar la composición.

b) Preparados: las mezclas o soluciones compuestas de dos o más sustancias.
c) Polímero: una sustancia constituida por moléculas caracterizadas por la secuencia de uno o varios tipos de unidades monoméricas y que incluye una mayoría ponderal simple de moléculas que contiene al menos tres unidades monoméricas con enlaces de covalencia con otra unidad monomérica u otro reactante como mínimo y constituida por menos de una mayoría ponderal simple de moléculas del mismo peso molecular. Dichas moléculas deben repartirse en una distribución de pesos moleculares en la que las diferencias de peso molecular puedan principalmente atribuirse a diferencias en el número de unidades monoméricas. En el contexto de esta definición, se entenderá por «unidad monomérica» la forma reactada de un monómero en un polímero.
d) Notificación: acción por la cual son presentados a la autoridad competente los documentos correspondientes a la sustancia, con la información requerida, correspondiendo la obligación de realizar esta notificación a:

1.° El fabricante que comercialice una sustancia como tal, o incorporada a un preparado, para las sustancias fabricadas en la Comunidad.
2.° Para las sustancias que se introduzcan en el territorio de la Comunidad, por haber sido fabricadas fuera de la misma, o por proceder de una reimportación desde un país tercero: una persona física o jurídica, establecida en la Comunidad, que sea responsable de la comercialización de la sustancia como tal o incorporada a un preparado; o bien por la persona establecida en la Comunidad que sea designada por el fabricante como su representante único, a efectos de la presentación de la notificación para una sustancia determinada comercializada como tal o incorporada a un preparado.

e) Notificante: persona que presenta a la autoridad competente la notificación, de acuerdo con lo establecido en apartado d).
f) Comercialización: el suministro o puesta a disposición de terceros del producto. A efectos del presente Reglamento, la importación en el territorio aduanero de la Comunidad se considerará comercialización.
g) Investigación y desarrollo científico: las investigaciones químicas, los análisis y los experimentos científicos efectuados bajo condiciones controladas; esta definición incluye la determinación de las propiedades intrínsecas, del rendimiento y de la eficacia, así como la investigación científica relacionada con el desarrollo de productos.
h) Investigación y desarrollo de la producción: el desarrollo ulterior de una sustancia durante el cual se prueban sus ámbitos de aplicación, utilizando producciones piloto o ensayos de producción.
i) EINECS: Inventario Europeo de Sustancias Comerciales Existentes. Dicho inventario establece la lista definitiva de todas las sustancias que en principio se encontraban en el mercado comunitario al 18 de septiembre de 1981.

j) ELINCS: Inventario Europeo de Sustancias Químicas Notificadas.

k) Identificación de los peligros: la identificación de los efectos indeseables que una sustancia es intrínsecamente capaz de provocar.

l) Evaluación de la relación dosis (concentración)/respuesta (efecto): la estimación de la relación entre la dosis o el nivel de exposición a una sustancia y la incidencia y la gravedad del efecto.

ll) Evaluación de la exposición: es el cálculo de las concentraciones o dosis a las cuales están o van a estar expuestas las poblaciones humanas o los compartimentos del medio ambiente, resultado de la determinación de las emisiones, vías de transferencia y tasas de movimiento de una sustancia y de su transformación o degradación.

m) Caracterización del riesgo: la estimación de la incidencia y gravedad de los efectos adversos probables en una población humana o un compartimento del medio ambiente, debidos a la exposición real o prevista a la sustancia; puede incluir la «estimación del riesgo», es decir, la cuantificación de esa probabilidad.

n) Recomendaciones para reducir el riesgo: la recomendación de medidas que permitan disminuir los riesgos que para el ser humano y el medio ambiente lleva aparejados la comercialización de la sustancia.

2. A efectos del presente Reglamento, se considerarán peligrosas las siguientes sustancias y preparados:

a) Explosivos: las sustancias y preparados sólidos, líquidos, pastosos, o gelatinosos que, incluso en ausencia de oxígeno atmosférico, puedan reaccionar de forma exotérmica con rápida formación de gases y que, en determinadas condiciones de ensayo, detonan, deflagran rápidamente o bajo el efecto del calor, en caso de confinamiento parcial, explosionan.

b) Comburentes: las sustancias y preparados que, en contacto con otras sustancias, en especial con sustancias inflamables, produzcan una reacción fuertemente exotérmica.

c) Extremadamente inflamables: las sustancias y preparados líquidos que tengan un punto de ignición extremadamente bajo y un punto de ebullición bajo, y las sustancias y preparados gaseosos que, a temperatura y presión normales, sean inflamables en contacto con el aire.

d) Fácilmente inflamables: las sustancias y preparados:

1.° Que puedan calentarse e inflamarse en el aire a temperatura ambiente sin aporte de energía, o

2.° Los sólidos que puedan inflamarse fácilmente tras un breve contacto con una fuente de inflamación y que sigan quemándose o consumiéndose una vez retirada dicha fuente, o

3.° Los líquidos cuyo punto de ignición sea muy bajo, o

4.° Que, en contacto con el agua o con el aire húmedo, desprendan gases extremadamente inflamables en cantidades peligrosas.

e) Inflamables: las sustancias y preparados líquidos cuyo punto de ignición sea bajo.

f) Muy tóxicos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en muy pequeña cantidad puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.

g) Tóxicos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.

h) Nocivos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.

i) Corrosivos: las sustancias y preparados que, en contacto con tejidos vivos puedan ejercer una acción destructiva de los mismos.

j) Irritantes: las sustancias y preparados no corrosivos que, en contacto breve, prolongado o repetido con la piel o las mucosas puedan provocar una reacción inflamatoria.

k) Sensibilizantes: las sustancias y preparados que, por inhalación o penetración cutánea, puedan ocasionar una reacción de hipersensibilidad, de forma que una exposición posterior a esa sustancia o preparado dé lugar a efectos negativos característicos.

l) Carcinogénicos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan producir cáncer o aumentar su frecuencia.

m) Mutagénicos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, puedan producir alteraciones genéticas hereditarias o aumentar su frecuencia.

n) Tóxicos para la reproducción: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, puedan producir efectos negativos no hereditarios en la descendencia, o aumentar la frecuencia de éstos, o afectar de forma negativa a la función o a la capacidad reproductora.

o) Peligrosos para el medio ambiente: las sustancias y preparados que presenten o puedan presentar un peligro inmediato o futuro para uno o más componentes del medio ambiente.

CAPITULO II

Ensayos, evaluación y clasificación de las sustancias peligrosas

Artículo 3. *Ensayos.*

Los ensayos de los productos químicos se realizarán conforme a los métodos recogidos en el anexo V del presente Reglamento. La determinación de las propiedades físico-químicas, toxicológicas y ecotoxicológicas se realizarán de acuerdo con las partes A, B y C respectivamente de dicho anexo.

No obstante, para determinadas sustancias incluidas en el EINECS, es posible que se hayan obtenido datos con ensayos diferentes a los citados anteriormente. Se habrá de estudiar en cada caso considerando, entre otros, los siguientes factores, necesidad de reducir al mínimo los ensayos efectuados con animales vertebrados, si los datos son suficientes en relación con los criterios generales de clasificación y etiquetado, o si deben efectuarse ensayos complementarios de acuerdo con el citado anexo V.

Los ensayos de laboratorio se realizarán conforme al Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y al Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Artículo 4. *Evaluación del riesgo de las sustancias nuevas.*

La evaluación de los riesgos reales o potenciales para el hombre y el medio ambiente se efectuará basándose en los principios que a continuación se establecen:

1. Principios de evaluación del riesgo.

a) La evaluación del riesgo llevará consigo la identificación del peligro y, en su caso, la evaluación de la

relación dosis (concentración)-respuesta (efecto), la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo. Esto se hará con arreglo a los procedimientos que disponen los apartados 2 y 3 de este artículo.

b) Independientemente del anterior apartado a), en relación con efectos particulares como la disminución de ozono, a los que no se pueden aplicar los apartados 2 y 3 de este artículo, los riesgos asociados a tales efectos se evaluarán caso por caso y la autoridad competente adjuntará una descripción y justificación completas de esa evaluación, al informe escrito presentado a la Comisión con arreglo al apartado 4.c) de este artículo.

c) Al realizar una evaluación de la exposición, la autoridad competente tendrá en cuenta las poblaciones humanas o los compartimentos del medio ambiente en los que es razonable prever una exposición a la sustancia según la información que sobre esta última se posee, prestando una atención particular al almacenamiento, la formulación en un preparado u otro tipo de elaboración, utilización y eliminación o recuperación.

d) La evaluación del riesgo conducirá a una o más de las conclusiones siguientes:

1.° La sustancia no plantea problemas de forma inmediata y no es preciso estudiarla de nuevo hasta que se disponga de más información con arreglo a los apartados 2 del artículo 7, 2 y 4 del artículo 8, ó 1 del artículo 14 del presente Reglamento.

2.° La sustancia plantea problemas, en cuyo caso la autoridad competente decidirá qué información adicional se necesita para revisar la evaluación, pero aplazará solicitar esa información hasta que la cantidad comercializada alcance el umbral de tonelaje que se indica en el apartado 2 del artículo 7 y de los apartados 2 y 4 del artículo 8 del presente Reglamento.

3.° La sustancia plantea problemas y deberá exigirse inmediatamente información adicional.

4.° La sustancia plantea problemas y la autoridad competente deberá hacer inmediatamente recomendaciones para reducir el riesgo.

e) Cuando la evaluación del riesgo indique que son de aplicación las conclusiones de los incisos 2.°, 3.°o 4.° del apartado 1.d) del presente artículo, el notificante puede ser informado de las conclusiones por la autoridad competente, dándosele la oportunidad de comentarlas y de proporcionar información adicional. La autoridad competente utilizará cualquier información pertinente para revisar la evaluación del riesgo antes de enviarla a la Comisión.

f) La autoridad competente, cuando haga recomendaciones para reducir el riesgo debido a una sustancia, tendrá en cuenta la posibilidad de que la reducción de la exposición de determinados compartimentos ambientales o poblaciones humanas puede aumentar la exposición de otros compartimentos ambientales o poblaciones humanas.

g) Las recomendaciones formuladas por la autoridad competente a los responsables de las sustancias, para reducir el riesgo de las mismas, podrán consistir, entre otras en:

1.° Modificaciones de la clasificación, envasado o etiquetado de la sustancia propuestas por el notificante en la notificación presentada en virtud del apartado 1 del artículo 7 y de los apartados 1 ó 3 del artículo 8 del presente Reglamento.

2.° Modificaciones de la ficha de datos de seguridad, propuesta por el notificante en la notificación presentada en virtud de los apartados 1 del artículo 7 y 1 ó 3 del artículo 8 del presente Reglamento.

3.° Modificaciones de los métodos y precauciones o medidas de emergencia recomendados, como se establece en las secciones 2.3, 2.4 y 2.5 de los anexos VII A, VII B, VII C o VII D, propuestos por el notificante en la documentación técnica de la notificación presentada en virtud del apartado 1 del artículo 7 y de los apartados 1 ó 3 del artículo 8 del presente Reglamento.

h) Por otra parte, la autoridad competente para la evaluación del riesgo de las sustancias, podrá transmitir a los órganos de las Comunidades Autónomas responsables del control y vigilancia los consejos u orientaciones necesarios para la adopción de las medidas más adecuadas para la protección de la población y del medio ambiente.

2. Evaluación del riesgo: salud humana.

a) La autoridad competente realizará una evaluación del riesgo en cada una de las sustancias notificadas con arreglo a los apartados 1 del artículo 7 y 1 ó 3 del artículo 8 del presente Reglamento; el primer estadio de esa evaluación consistirá en la identificación de los peligros relacionados, como mínimo, con las propiedades y los efectos adversos especificados en la parte 1.ª de los anexos X.A, y X.B. Una vez identificados los peligros, la autoridad competente procederá a la siguiente serie de medidas, que se llevará a cabo con arreglo a las directrices marcadas en la parte 2.ª de los anexos X.A y X.B:

1.° Evaluación de la relación dosis (concentración) respuesta (efecto), cuando proceda.

2.° Evaluación de la exposición para cualquiera de las poblaciones humanas (es decir, trabajadores, consumidores y la población expuesta indirectamente por el medio ambiente) que pueden estar expuestas a la sustancia.

3.° Caracterización del riesgo.

b) Como excepción del anterior apartado a):

1.° Si se han realizado los ensayos adecuados para identificar los peligros derivados de un efecto o una propiedad particular y con los resultados no se clasifica la sustancia con arreglo al presente Reglamento, no es obligatorio incluir en la evaluación del riesgo para ese efecto o propiedad, las medidas de los incisos 1.°, 2.° y 3.° del anterior apartado a) en cuyo caso se aplicará la conclusión del inciso 1.° del apartado 1.d) de este artículo, salvo que haya otros motivos razonables de preocupación, y

2.° Si no se han hecho todavía los ensayos adecuados para identificar los peligros derivados de un efecto o de una propiedad particular, este efecto o propiedad no se tendrá en cuenta en la evaluación del riesgo, salvo que haya otros motivos razonables de preocupación.

3. Evaluación del riesgo: medio ambiente.

a) La autoridad competente llevará a cabo una evaluación del riesgo relacionado con los efectos ambientales de cada sustancia notificada con arreglo a los apartados 1 del artículo 7 y 1 ó 3 del artículo 8 del presente Reglamento; la primera etapa de dicha evaluación consistirá en la identificación de los peligros. Una vez hecha dicha identificación, la autoridad competente procederá a la secuencia de las medidas siguientes, que se realizará con arreglo a las directrices que marca el anexo X.C:

1.° Evaluación de la relación dosis (concentración) respuesta (efecto), cuando proceda.

2.° Evaluación de la exposición en los compartimentos ambientales (medio acuático, medio terrestre y aire) que pueden verse expuestos a la sustancia.

3.° Caracterización del riesgo.

b) Como excepción al anterior apartado a):

1.° En el caso de las sustancias notificadas con arreglo al apartado 1 del artículo 7 del presente Reglamento pero no clasificadas como peligrosas para el medio ambiente, no será necesario incluir en la evaluación del riesgo las medidas de los incisos 1.°, 2.° y 3.° del anterior apartado a) y se aplicará la conclusión del inciso 1.°del apartado 1.d) de este artículo, salvo que haya otros motivos razonables de alarma, y

2.° En el caso de las sustancias notificadas con arreglo a los apartados 1 ó 3 del artículo 8 del presente Reglamento, si no hay datos suficientes para determinar si es adecuada la clasificación como peligrosa para el medio ambiente, la identificación de los peligros llevará consigo el plantearse si hay o no cualesquiera motivos de alarma en relación con los efectos ambientales sobre la base de otros datos, por ejemplo, datos sobre las propiedades fisicoquímicas y tóxicológicas. Salvo que existan motivos razonables, no será necesario incluir en la evaluación del riesgo las medidas de los incisos 1.°, 2.° y 3.° del anterior apartado a) y se aplicará la conclusión del inciso 1.°del apartado 1.d) de este artículo.

4. Conclusiones de la evaluación del riesgo.

a) Una vez realizada la evaluación del riesgo con arreglo a los apartados 2 y 3 de este artículo y los anexos X.A, X.B y X.C, la autoridad competente, de conformidad con el anexo X.D, determinará cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) de este artículo le es de aplicación y tomará las medidas descritas en el apartado 1.e) de este artículo en caso de ser necesarias.

b) La evaluación del riesgo realizada de acuerdo con los apartados 2 y 3 de este artículo, y con los anexos X.A, X.B y X.C, se revisará y, si fuera necesario, se modificará a la luz de la información adicional que se reciba con arreglo a los apartados 2 del artículo 7, 2 y 4 del artículo 8, 1 del artículo 14 y el artículo 16 del presente Reglamento o de otras fuentes.

c) Una vez realizada la evaluación del riesgo con arreglo a los apartados 2 y 3 de este artículo y elaboradas las conclusiones con arreglo a los apartados anteriores, la autoridad competente preparará un informe escrito que contenga al menos la información que determina el anexo X.E. Este informe se enviará a la Comisión de la CE y se actualizará tras cada revisión de la evaluación que se haga a la luz de la información adicional. El informe actualizado se enviará a la Comisión.

d) El notificante podrá solicitar una copia del informe de evaluación del riesgo o de cualquier revisión que sobre la misma se efectúe.

Artículo 5. *Clasificación de las sustancias.*

1. La clasificación de las sustancias se efectuará en función de sus propiedades intrínsecas, con arreglo a las categorías definidas en el apartado 2 del artículo 2. Al clasificar las sustancias, se tendrán en cuenta las impurezas cuando su concentración sobrepase los límites previstos en el apartado 4 del presente artículo y en el artículo 3 del Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos.

2. Los principios generales de la clasificación y etiquetado de sustancias y preparados se aplicarán de acuerdo con los criterios establecidos en el anexo VI del presente Reglamento, salvo que existan disposiciones específicas opuestas a las normas reguladoras de los preparados peligrosos.

3. La lista de sustancias químicas peligrosas contenidas en el anexo I de este Reglamento, están clasificadas y etiquetadas conforme a los principios generales enunciados en los anteriores apartados 1 y 2.

4. Las sustancias peligrosas que figuran en el anexo I, deberán, cuando proceda, ir acompañadas de la especificación de los límites de concentración o de parámetros que permitan sopesar los peligros para la salud y para el medio ambiente de los preparados que contengan dichas sustancias peligrosas o las sustancias que contengan otras sustancias peligrosas como impurezas.

5. Los fabricantes, distribuidores e importadores de sustancias peligrosas no incluidas en el anexo I pero enumeradas en el EINECS, deberán llevar a cabo las oportunas investigaciones con relación a las propiedades de dichas sustancias, y envasar y etiquetar provisionalmente las mismas con arreglo a lo establecido en los artículos 18 a 21 y a los criterios del anexo VI.

Artículo 6. *Obligaciones exigibles para la comercialización de las sustancias.*

1. Sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 13 las sustancias, en su estado natural o incorporadas en preparados, sólo podrán comercializarse si:

a) Han cumplido los requisitos de notificación a la autoridad competente de acuerdo con lo previsto en el presente Reglamento.

b) Cumplen las condiciones de envasado y etiquetado contenidas en el presente Reglamento, con arreglo a los criterios establecidos en el anexo VI y en función de los resultados de los ensayos a que se refieren los anexos VII y VIII, salvo en el caso de preparados que sean objeto de otras disposiciones específicas.

c) Cumplen las obligaciones relativas a la ficha de datos de seguridad en los términos previstos en el artículo 23.

2 .Las condiciones de etiquetado y envasado descritas en el apartado 1. b) anterior serán exigibles a las sustancias, en tanto en cuanto no estén incluidas en el anexo I o hasta que se deniegue su inclusión.

CAPITULO III

Notificación de sustancias nuevas

Artículo 7. *Notificación completa.*

1. Sin perjuicio de lo establecido en el apartado 2 del artículo 1, en el apartado 1 del artículo 8, en el artículo 13 y en el apartado 1 del artículo 16, cualquier notificante de una sustancia tendrá que presentar, a la autoridad competente, una notificación que contenga los siguientes documentos:

a) Un informe técnico-científico que contenga la información necesaria para la evaluación de los peligros previsibles, inmediatos o futuros, que la sustancia pueda presentar para el hombre y el medio ambiente. Dicho informe contendrá como mínimo los datos y resultados de los ensayos, a que se refiere el anexo VII A y VII D en su caso, así como una descripción completa y detallada de los mismos y de los métodos aplicados o de sus referencias bibliográficas.

b) Una declaración sobre los efectos desfavorables de la sustancia según los usos previstos.

c) Una propuesta de clasificación y etiquetado de la sustancia conforme al presente Reglamento, y

d) Unicamente en el caso de las sustancias peligrosas, una propuesta de ficha de datos de seguridad.

e) En caso de que el fabricante este establecido fuera del mercado interior, el notificante, deberá adjuntar, en su caso, una declaración del fabricante que le acredite haber sido designado como su único representante, al objeto de la notificación de la sustancia en cuestión.

f) Una declaración del notificante cuando, justificándolo debidamente no desee que se le aplique a la noti-

ficación el apartado 2 del artículo 15 durante un plazo máximo que no podrá exceder de un año a partir de la fecha de la notificación.

g) El notificante también podrá facilitar a la autoridad una primera evaluación de los riesgos, efectuada por el mismo, con arreglo a los principios a que se refiere el artículo 4.

2. Sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 14, el notificante de una sustancia ya notificada deberá informar a la autoridad competente:

a) Cuando la cantidad de la sustancia comercializada alcance las 10 toneladas por año y fabricante, o cuando la cantidad total comercializada alcance la cifra de 50 toneladas por fabricante. El notificante deberá informar a la autoridad competente y ésta en el plazo que determine, podrá exigir que se realicen todos o algunos de los ensayos que se especifican en el nivel 1 del anexo VIII del presente Reglamento.

b) Cuando la cantidad de sustancia comercializada alcance las 100 toneladas por año y fabricante o cuando la cantidad total comercializada alcance la cifra de 500 toneladas por fabricante. El notificante informará a la autoridad competente y esta en el plazo que determine, exigirá que se realicen los ensayos que se especifican en el nivel 1 del anexo VIII, salvo que el notificante justifique que determinado ensayo o estudio no es adecuado o que sería más conveniente realizar un ensayo o un estudio científico alternativo.

c) Cuando la cantidad de sustancia comercializada alcance las 1.000 toneladas por año y fabricante o cuando la cantidad total comercializada alcance la cifra de 5.000 toneladas por fabricante. El notificante informará a la autoridad competente, la cual elaborará un programa de ensayos de acuerdo con el nivel 2 del anexo VIII, para que sean realizados por el notificante en el plazo que determine la autoridad competente.

3. Cuando se realicen ensayos complementarios, de acuerdo con lo dispuesto en el apartado 2, o bien con carácter voluntario, el notificante deberá presentar los resultados de los estudios efectuados a la autoridad competente.

Artículo 8. *Notificación Simplificada.*

1. Sin perjuicio de lo dispuesto en el apartado 2 del artículo 1, en el apartado 1 del artículo 13 y en el apartado 1 del artículo 16, todo notificante que tenga la intención de comercializar una sustancia en cantidades inferiores a 1 tonelada por año y fabricante deberá presentar a la autoridad competente una notificación que contenga los siguientes documentos:

a) Un informe técnico-científico que contenga la información necesaria para la evaluación de los peligros previsibles, inmediatos o futuros, que la sustancia pueda presentar para el hombre y el medio ambiente. Dicho informe contendrá como mínimo los datos y resultados de los ensayos a que se refiere el anexo VII B y VII D, en su caso, así como una descripción completa y detallada de los mismos y de los métodos aplicados o de sus referencias bibliográficas.

b) Todos los documentos contenidos en los apartados b), c), d), e), f) y g), a que se refiere el artículo 7.1.

2. Antes de que la cantidad de sustancia comercializada alcance una tonelada por año y fabricante o antes de que la cantidad total comercializada alcance 5 toneladas por fabricante, el notificante deberá presentar a la autoridad competente una notificación completa con arreglo a lo dispuesto en el artículo 7.

3. Cuando las cantidades comercializadas sean inferiores a 100 kilogramos por año y fabricante, el notificante deberá incluir la información y los resultados de los ensayos mencionados en el anexo VII C y VII D en su caso, sin perjuicio de lo establecido en el apartado 1 del artículo 16.

4. Antes de que la cantidad de la sustancia comercializada alcance 100 kilogramos por año y fabricante o antes de que la cantidad total comercializada alcance los 500 kilogramos por fabricante, el notificante deberá facilitar a la autoridad competente, la información adicional necesaria para completar el informe técnico de acuerdo con el anexo VII B y VII D en su caso.

5. Las sustancias notificadas de acuerdo con los apartados 1 y 3 anteriores deberán ser envasadas y etiquetadas provisionalmente con arreglo a lo dispuesto en los artículos 18 a 21 y con los criterios previstos en el anexo VI.

Cuando no fuera posible cumplir las condiciones de etiquetado de acuerdo con el artículo 19, en la etiqueta deberá figurar, la mención «Precaución: no se han realizado pruebas completas de esta sustancia», además del etiquetado resultante de los ensayos ya realizados.

Artículo 9. *Sustancias ya notificadas (regla de los diez años).*

Cuando una sustancia haya sido notificada, y los documentos exigidos para la misma se hubieran presentado con diez años de antelación, el notificante no estará obligado a proporcionar la información a que se hace referencia en los artículos 7 y 8 para los informes técnicos contemplados en el anexo VII A, VII B, VII C ó VII D excepción hecha de lo dispuesto en los apartados 1 y 2 de dichos anexos.

Artículo 10. *Comercialización de las sustancias notificadas.*

1. En el caso de las notificaciones completas previstas en el apartado 1 del artículo 7, la autoridad competente dispondrá de un plazo de sesenta días, desde la fecha de notificación de la sustancia, para la formulación de las observaciones que considere necesarias.

Transcurrido dicho plazo de sesenta días, se entenderá que la notificación realizada cumple con los requisitos reglamentariamente establecidos, pudiendo procederse a comercializar la sustancia. En este plazo queda incluido el plazo de veinte días para la emisión de la certificación prevista en el artículo 44 de la ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, certificación que podrá ser solicitada por el notificante una vez transcurridos cuarenta días desde la presentación de la notificación de la sustancia. Todo ello, sin perjuicio de las obligaciones subsistentes para la autoridad competente, conforme a lo previsto en el artículo 16.2.

Si la autoridad competente considera que el contenido de la notificación no se ajusta a lo dispuesto en el presente reglamento, y de acuerdo con lo previsto en el artículo 16.2, lo comunicará por escrito al notificante, poniéndole de manifiesto la documentación o requisitos que serían necesarios para la evaluación positiva del expediente.

En el caso de que el notificante presente nueva documentación, en cumplimiento de las exigencias de la autoridad competente, ésta dispondrá de un nuevo plazo de sesenta días para el estudio de la misma, siendo de aplicación lo previsto en el punto anterior.

2. En el caso de notificaciones simplificadas, previstas en los apartados 1 ó 3 del artículo 8 la autoridad competente dispondrá de un plazo de treinta días, desde

la fecha de notificación de la sustancia, para la formulación de las observaciones que considere necesarias. Transcurrido dicho plazo, se entenderá que la notificación realizada cumple con los requisitos reglamentarios establecidos, pudiendo procederse a comercializar la sustancia, sin perjuicio de las obligaciones de la autoridad competente conforme al artículo 16.3.

Si la autoridad competente considera que el contenido de la notificación no se ajusta a lo dispuesto en el presente reglamento, y de acuerdo con lo previsto en el artículo 16.3, lo comunicará por escrito al notificante, poniéndole de manifiesto la documentación o requisitos que serían necesarios para la evaluación positiva del expediente.

En el caso de que el notificante presente nueva documentación, en cumplimiento de las exigencias de la autoridad competente, ésta dispondrá de un nuevo plazo de treinta días para el estudio de la misma, siendo de aplicación lo previsto en el punto anterior.

3. No obstante lo establecido en los apartados anteriores, en ningún caso podrán comercializarse las sustancias notificadas, antes de que hayan transcurrido quince días desde que la autoridad competente haya recibido el expediente de notificación, aún cuando el notificante reciba dentro de ese plazo comunicación escrita con la aceptación de la sustancia notificada.

Artículo 11. *Control de las cantidades de una sustancia que se introduzca en territorio de la Comunidad procedente de países terceros.*

Cuando se trate de sustancias fabricadas fuera del mercado interior, o que hayan accedido al mismo como consecuencia de reimportación desde países terceros, y exista más de una notificación sobre una sustancia producida por el mismo fabricante, la Comisión y la autoridad competente determinará las cantidades anuales acumuladas comercializadas en el mercado interior basándose en las informaciones comunicadas con arreglo a lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 7, en el apartado 1 del artículo 8 y el artículo 14.

La obligación de efectuar ensayos complementarios de conformidad de lo dispuesto en el apartado 2 del artículo 7 se refiere de forma colectiva a todos los notificantes.

Artículo 12. *Polímeros.*

Los informes técnicos contenidos en las notificaciones y mencionados en el apartado 1 del artículo 7 y en el apartado 1 del artículo 8 para los polímeros, deberán incluir los datos y resultados de los estudios a que se refiere el anexo VII D del presente Reglamento.

CAPITULO IV

Exenciones a la Notificación

Artículo 13. *Exenciones.*

1. Quedan exentas del procedimiento de notificación establecido en los artículos 7, 8, 14, y 15:

a) Las sustancias que figuran en el EINECS.

b) Los aditivos y las sustancias de uso exclusivo en la alimentación animal.

c) Las sustancias utilizadas exclusivamente como aditivos alimentarios y como aromas en los productos alimenticios.

d) Los ingredientes activos utilizados exclusivamente para los medicamentos de uso humano y veterinario, sin que se incluyan los productos químicos intermedios.

e) Los ingredientes activos utilizados exclusivamente para los productos fitosanitarios, y

f) Las sustancias utilizadas exclusivamente para otras categorías de productos para las que existan procedimientos de notificación o de homologación idénticos a los exigidos en el presente reglamento.

2. Se considerará que las sustancias que a continuación se enumeran han sido notificadas de acuerdo con el presente Reglamento cuando se cumplan las condiciones siguientes:

a) Los polímeros, salvo los que contengan un 2 por 100 o más en forma ligada, de una sustancia que no figure en el EINECS.

b) Las sustancias comercializadas en cantidades inferiores a los 10 kilogramos por fabricante y año, siempre que el fabricante/importador cumpla toda la información contemplada en los apartados 1 y 2 del anexo VII C.

c) Las sustancias comercializadas en cantidades limitadas, que, en cualquier caso no sobrepasen 100 kilogramos por fabricante y año, destinadas exclusivamente con fines de investigación y desarrollo científico realizados bajo condiciones de control.

Todo fabricante o importador que se acoja a esta exención deberá llevar un registro con la denominación de la sustancia, los datos de etiquetado, las cantidades y la lista de clientes; esta información deberá hallarse a disposición de la autoridad competente donde se efectúen la fabricación, la importación o las actividades de investigación y desarrollo científicos.

d) Las sustancias comercializadas para fines de investigación y desarrollo de la producción en cantidades limitadas a las necesidades de dicha investigación y desarrollo, con un número restringido de clientes registrados. Estas sustancias podrán acogerse a esta exención por un período de un año, siempre que el fabricante o el importador comunique su denominación, los datos utilizados en el etiquetado, la cantidad de la sustancia, la justificación de la cantidad, la lista de los clientes y el programa de investigación y desarrollo a la autoridad competente en que se haya efectuado la fabricación, importación o la investigación y desarrollo, siempre que se ajuste a las disposiciones que haya adoptado a este efecto dicha autoridad, la cual podrá solicitar la información exigida en el artículo 8.

Transcurrido un año, dichas sustancias deberán ser notificadas. El fabricante o el importador deberá ofrecer una garantía de que la sustancia o el preparado al que ésta se halle incorporada, serán manejados únicamente por el personal del cliente bajo condiciones de control y que en ningún momento ni la sustancia ni el preparado se pondrán al alcance del público en general. Además si la autoridad competente considera que puede existir un riesgo inaceptable para el hombre y el medio ambiente podrá ampliar la restricción antes mencionada incluyendo cualquier producto que contenga la nueva sustancia, y que haya sido fabricada durante la investigación y desarrollo de la producción.

El período de exención de un año podrá ser ampliado a un año más en circunstancias excepcionales, si el notificante puede justificar la necesidad de dicha ampliación ante la autoridad competente.

3. Siempre que las propiedades de peligrosidad de las sustancias a que se refiere el apartado 2 sean conocidas, el fabricante o su representante deberán envasar y etiquetar las sustancias provisionalmente, de acuerdo con las normas de los artículos 18 a 21 y con los criterios establecidos en el anexo VI.

Cuando no sea posible etiquetarlas debido a que los resultados de los ensayos a que se refiere el anexo VII A y VII D en su caso estén incompletos, la etiqueta, de acuerdo con los principios que se fijan en el artícu-

lo 19, habrá de llevar además del etiquetado derivado de las pruebas ya realizadas: «Precaución: no se han realizado pruebas completas de esta sustancia».

4. Cuando alguna de las sustancias a que se refiere el apartado 2, etiquetada según lo dispuesto en el artículo 19, sea muy tóxica, tóxica, mutagénica, tóxica para la reproducción o carcinogénica, el fabricante o importador de la misma habrá de poner en conocimiento de la autoridad competente toda la información según lo establecido en los puntos 2.3, 2.4 y 2.5 del anexo VII A, y en su caso lo establecido en el anexo VII D. Además se facilitará los datos sobre toxicidad aguda si se dispone de los mismos.

CAPITULO V

Nueva información y notificaciones posteriores de una nueva sustancia

Artículo 14. *Información posterior.*

1. Todo notificante de una sustancia ya notificada de acuerdo con el apartado 1 del artículo 7 o con el apartado 1 del artículo 8 deberá, por propia iniciativa y bajo su responsabilidad, informar por escrito a la autoridad competente de:

a) Las variaciones en las cantidades anuales o totales que se hayan comercializado en el mercado interior por él o, en su caso, por el representante único.

b) Los nuevos conocimientos acerca de los efectos que la sustancia puede producir en el hombre y/o en el medio ambiente.

c) Los nuevos usos para los que se comercialice la sustancia de la que sea razonable suponer que el notificante ya está enterado.

d) Cualquier modificación relativa a la composición de la sustancia tal y como figura en los anexos VII A, VII B o en el apartado 1.3 del anexo VII C, y en el anexo VII D.

e) Cualquier cambio de su situación como fabricante o importador.

2. Todo importador de una sustancia producida fuera del mercado interior y notificada previamente por un representante único, deberá asegurarse de que dicho representante dispone de información actualizada de las cantidades de la sustancia importadas por él en el mercado interior.

Artículo 15. *Notificaciones posteriores de una misma sustancia y procedimiento para evitar la repetición de ensayos sobre animales vertebrados.*

1. En caso de que una sustancia ya haya sido notificada de acuerdo con el apartado 1 del artículo 7 o el apartado 1 del artículo 8, la autoridad competente podrá decidir que el siguiente notificante de la misma sustancia, por lo que respecta a los apartados 3, 4 y 5 de los anexos VII A, VII B, y VII D y los apartados 3 y 4 del anexo VII C, se pueda remitir a los resultados de los ensayos y estudios comunicados por el primer notificante, si el notificante posterior demuestra que la sustancia notificada por segunda vez es la misma que la primera, y de que también coinciden el grado de pureza y la naturaleza de las impurezas. El primer notificante deberá dar su acuerdo por escrito a la utilización de los ensayos o estudios comunicados por él antes de dicha utilización.

2. Antes de efectuar ensayos sobre animales vertebrados, con el fin de presentar una notificación de acuerdo con lo establecido en el apartado 1 del artículo 7 y en el apartado 1 del artículo 8 y sin perjuicio de lo previsto en el apartado 1 del presente artículo, los futuros notificantes deberán solicitar la siguiente información a la autoridad competente del Estado miembro en el que tienen intención de presentar la notificación:

a) Si la sustancia que tienen intención de notificar ha sido ya notificada o no.

b) El nombre y la dirección del primer notificante.

Esta solicitud irá acompañada de justificantes que demuestren que el futuro notificante tiene intención de comercializar la sustancia. Deberá indicar, igualmente, las cantidades que pretenda comercializar.

Para el supuesto de que:

a) La autoridad competente que recibe la notificación tenga la seguridad de que el futuro notificante tiene intención de comercializar la sustancia en las cantidades indicadas.

b) La sustancia ya haya sido notificada anteriormente, y

c) El primer notificante no haya solicitado ni se le haya concedido una exención temporal de lo dispuesto en el presente artículo, la autoridad competente proporcionará al futuro notificante el nombre y la dirección del primer notificante y además informará a este último del nombre y de la dirección de aquél.

El primer notificante y el futuro notificante deberán tomar todas las medidas necesarias para llegar a un acuerdo sobre el intercambio de información y evitar así la repetición de ensayos sobre animales vertebrados.

3. Los notificantes de la misma sustancia que hayan llegado a un acuerdo para intercambiar información relativa al anexo VII, conforme a lo establecido en los apartados 1 y 2, deberán asimismo tomar todas las medidas necesarias para llegar a un acuerdo en lo referente al intercambio de información acerca de ensayos realizados sobre animales vertebrados de conformidad con el artículo 7.2.

4. Si, a pesar de lo dispuesto en los apartados 2 y 3, los notificantes y los futuros notificantes de una misma sustancia siguieran sin ponerse de acuerdo para compartir la información, la autoridad competente podrá, por lo que respecta a los notificantes y a los futuros notificantes, establecer medidas que comprometan a los notificantes y a los futuros notificantes a compartir la información con objeto de evitar que se repitan ensayos sobre animales vertebrados y determinar a la vez el procedimiento para la utilización de las informaciones, incluidas las disposiciones sobre la excepción temporal a que se hace mención en el apartado 1.f) del artículo 7 y el equilibrio razonable entre los intereses de las partes afectadas.

CAPITULO VI

Funciones de la autoridad competente. Confidencialidad de los datos

Artículo 16. *Funciones de la autoridad competente.*

1. La autoridad competente examinará la información a que se refieren los artículos 7 al 15 y decidirá si se ajusta a lo dispuesto en el presente Reglamento, y además podrá:

a) Pedir, si resultase necesario para evaluar el riesgo, más información y/o nuevos ensayos de verificación o confirmación de las sustancias o de sus productos de transformación, que hayan sido objeto de notificación o información de acuerdo con el presente Reglamento, así como solicitar la información contenida en el anexo VIII con anterioridad a lo previsto en el apartado 2 del artículo 7.

b) Recoger las muestras necesarias para el control.
c) Pedir al notificante que suministre las cantidades de la sustancia notificada consideradas necesarias para llevar a cabo los ensayos de verificación.
d) Adoptar las medidas adecuadas para una utilización más segura de las sustancias.

Para las sustancias notificadas con arreglo al apartado 1 del artículo 7 y a los apartados 1 y 3 del artículo 8, la autoridad competente que reciba la notificación efectuará una evaluación de los riesgos conforme a lo establecido en el artículo 4. La evaluación se pondrá al día periódicamente en función de las informaciones adicionales que sean facilitadas por el notificante.

2. Se establece un plazo de sesenta días a partir de la recepción de la notificación completa, en el que la autoridad competente deberá informar por escrito al notificante del curso que se haya dado a la misma, según se ajuste o no al presente Reglamento.

En el caso de ausencia de comunicación por la autoridad Competente, será de aplicación lo previsto en el artículo 10.1.

Si el expediente es aceptado, la autoridad competente comunicará al mismo tiempo al notificante el número oficial que haya sido asignado a su notificación.

En caso de que el expediente no sea aceptado, la autoridad competente requerirá del notificante la información complementaria necesaria para que el expediente de notificación se ajuste al presente Reglamento.

3. Se establece un plazo de treinta días a partir de la recepción de la notificación simplificada, en el que la autoridad competente deberá evaluar si dicha notificación cumple con el presente Reglamento.

Si el expediente es aceptado, la autoridad comunicará al mismo tiempo al notificante el número oficial que haya sido asignado a su notificación.

En caso de que el expediente no sea aceptado, la autoridad competente requerirá del notificante las informaciones complementarias necesarias para que el expediente de notificación se ajuste al presente Reglamento.

4. La autoridad competente calculará las cantidades anuales acumuladas de las sustancias fabricadas fuera del mercado interior de conformidad con el artículo 11. En caso de alcanzarse los umbrales que se fijan en el apartado 2 del artículo 7, la autoridad competente establecerá contacto con cada uno de los notificantes y les comunicará la identidad de los demás haciendo hincapié en la responsabilidad colectiva de los notificantes.

5. La autoridad competente participa en el sistema de intercambio de información de notificaciones, establecido entre la Comisión y los Estados miembros.

6. La autoridad competente garantizará la confidencialidad de los datos relativos a la explotación comercial y la fabricación de las sustancias.

7. Para el estudio de las notificaciones, la autoridad competente podrá recabar la colaboración y asesoría de expertos científicos y, en su caso, constituir grupos de trabajo especializados.

Artículo 17. *Confidencialidad de los datos.*

1. El notificante indicará qué datos deben mantenerse secretos, de los descritos en los artículos 7, 8 y 14, y cuya difusión podría perjudicarle en el terreno industrial o comercial y para los que exige el mantenimiento de secreto frente a cualquier persona que no sea la autoridad competente. En tal caso, dicha exigencia habrá de ser justificada.

No podrán estar protegidos por el secreto comercial e industrial los siguientes datos:

a) El nombre comercial de la sustancia.
b) El nombre del fabricante y el del notificante.
c) Los datos físico-químicos de la sustancia en relación con el apartado 3 del anexo VII.
d) Las posibilidades de hacer inofensiva la sustancia.
e) El resumen de los ensayos toxicológicos y ecotoxicológicos.
f) El grado de pureza de la sustancia y la identidad de las impurezas y/o aditivos conocidos como peligrosos según los criterios del apartado 2 del artículo 2, si fuera indispensable para proceder a su clasificación y etiquetado y para su inclusión en el anexo I.
g) Los métodos y precauciones recomendados en el apartado 2.3 del anexo VII y las medidas de urgencia mencionadas en los apartados 2.4 y 2.5 del anexo VII.
h) Los datos que figuren en la ficha de datos de seguridad, e
i) En el caso de las sustancias recogidas en el anexo I, los métodos analíticos que permitan detectar una sustancia peligrosa liberada en el medio ambiente y determinar el grado de exposición directa del ser humano.

Si el notificante, el fabricante o importador hace pública la información anteriormente considerada como confidencial, habrá de informar a la autoridad competente.

2. La autoridad competente decidirá qué información queda protegida por el secreto industrial y comercial de conformidad con el apartado 1 anterior.

La información considerada confidencial por la autoridad, será tratada como tal por la Comisión y por las restantes autoridades competentes de los Estados miembros y viceversa.

3. No obstante, en caso de procedimientos administrativos sancionadores o judiciales penales incoados en el ejercicio de la función o de control de las sustancias comercializadas, dicha información podrá ponerse en conocimiento de las personas directamente interesadas en tales procedimientos.

4. Las sustancias notificadas, que no estén clasificadas como peligrosas según los criterios del presente Reglamento, podrán figurar bajo su nombre comercial en la lista europea de sustancias químicas notificadas «ELINCS», cuando así lo solicite la autoridad competente y por un plazo máximo de tres años. No obstante, si la autoridad considera que la publicación de la denominación química según la nomenclatura de la «IUPAC» puede revelar información relativa a la comercialización o a la fabricación, la sustancia puede incluirse exclusivamente por su nombre comercial durante el período que la autoridad considere oportuno.

Si así lo solicita la autoridad, las sustancias peligrosas figurarán en el ELINCS únicamente bajo su nombre comercial hasta su inclusión en el anexo I.

CAPITULO VII

Envasado, etiquetado y ficha de datos de seguridad

Artículo 18. *Envasado.*

1. Las sustancias peligrosas sólo podrán comercializarse cuando sus envases se ajusten a las condiciones siguientes:

a) Estarán diseñados y fabricados de forma que no sean posibles pérdidas de contenido. No se aplicará esta condición cuando se prescriban dispositivos especiales de seguridad.
b) Los materiales con los que estén fabricados los envases y los cierres no deberán ser atacables por el contenido, ni formar con este último combinaciones peligrosas.
c) Los envases y los cierres habrán de ser fuertes y solidos con el fin de impedir aflojamientos y deberán responder de manera fiable a las exigencias de mantenimiento.

d) Los recipientes con un sistema de cierre reutilizable habrán de estar diseñados de forma que pueda cerrarse el envase varias veces sin perdida de su contenido.

e) Cualquiera que sea su capacidad, los recipientes que contengan sustancias vendidas al publico en general o puestas a disposición de éste, etiquetadas como «muy tóxicas», «tóxicas» o «corrosivas», deberá disponer de un cierre de seguridad para niños y llevar una indicación de peligro detectable al tacto.

f) Cualquiera que sea su capacidad, los recipientes que contengan sustancias vendidas al publico en general o puestas a disposición de éste, etiquetadas como «nocivas», «extremadamente inflamables» o «fácilmente inflamables», deberán llevar una indicación de peligro detectable al tacto.

2. Las especificaciones técnicas de los cierres de seguridad para niños, y dispositivos que permitan detectar los peligros al tacto, deberán ajustarse a las normas del anexo IX del presente Reglamento.

Artículo 19. *Etiquetado.*

1. Las sustancias peligrosas sólo podrá ser comercializadas cuando el etiquetado de sus envases, ostenten de manera legible e indeleble al menos en la lengua española oficial del Estado, las condiciones que a continuación se indican:

a) El nombre de la sustancia, con una de las denominaciones que figuran en el anexo I. Cuando la sustancia no estuviera en dicho anexo, se le dará el nombre utilizado en una nomenclatura internacionalmente reconocida.

b) El nombre y la dirección completa, incluido el número de teléfono, del responsable de la comercialización establecido en el mercado interior, bien sea el fabricante, el importador o el distribuidor.

c) Los símbolos y las indicaciones de peligro de acuerdo con el anexo II. Los símbolos deberán ir impresos en negro sobre un fondo amarillo anaranjado.

Para las sustancias peligrosas que figuren en el anexo I, se deben utilizar los símbolos e indicaciones de peligro que se indican en dicho anexo. Para las sustancias peligrosas que no figuran en el anexo I, los símbolos e indicaciones de peligro se atribuirán según las normas establecidas en el anexo VI.

Cuando una sustancia deba llevar más de un símbolo, se seguirán las siguientes reglas:

1.° La obligación de poner el símbolo T convierte en facultativos los símbolos X y C, salvo disposición contraria en el anexo I,

2.° La obligación de poner el símbolo C convierte en facultativo el símbolo X, y

3.° La obligación de poner el símbolo E convierte en facultativos los símbolos F y O.

d) Las frases tipo que indican los riesgos específicos derivados de los peligros de la sustancia (frases R), se ajustarán a las indicaciones del anexo III.

Para las sustancias peligrosas que figuran en el anexo I se deberán utilizar las frases R que se indican en dicho anexo. Para las sustancias que no figuran en el anexo I, las frases R se atribuirán según las normas establecidas en el anexo VI.

e) Las frases tipo que indican los consejos de prudencia en relación con el uso de la sustancia (frases S), se ajustarán a las indicaciones del anexo IV.

Para las sustancias peligrosas que figuran en el anexo I se deberán utilizar las frases S que se indican en dicho anexo. Para las sustancias peligrosas que no figuran en anexo I, las frases S se atribuirán según las normas establecidas en el anexo VI.

f) El número CEE, en caso de estar asignado. Este número se obtendrá a partir del «EINECS» o del «ELINCS».

g) Las sustancias que figuran en el anexo I, además, llevarán en la etiqueta la frase «etiqueta CEE».

2. En el caso de sustancias irritantes, fácilmente inflamables, inflamables o comburentes, no será necesario indicar las frases R y S cuando el contenido del envase no exceda de los 125 mililitros. Esta norma se aplicará también a las sustancias nocivas de igual contenido, cuando no se vendan al por menor al público en general.

3. Las indicaciones tales como «no tóxico», «inocuo» o cualquier otra indicación análoga no podrán figurar en la etiqueta ni en el envase de las sustancias reguladas por el presente Reglamento.

Artículo 20. *Aplicación de las condiciones de etiquetado.*

1. Cuando las indicaciones exigidas en el artículo 19 vayan consignadas en una etiqueta, ésta se fijará sólidamente en una o varias caras del envase, de forma que dichas indicaciones puedan leerse horizontalmente cuando el envase este colocado en posición normal.

Las dimensiones de la etiqueta deberán responder a los formatos siguientes:

Capacidad del envase	Formato — (En milímetros)
Inferior o igual a 3 litros	52 × 74 como mínimo.
Superior a 3 litros e inferior o igual a 50 litros	74 × 105 como mínimo.
Superior a 50 litros e inferior o igual a 500 litros	105 × 148 como mínimo.
Superior a 500 litros	148 × 210 como mínimo.

Cada símbolo deberá ocupar por lo menos la décima parte de la superficie de la etiqueta, no siendo en ningún caso inferior a 1 cm^2. La etiqueta tendrá que ir adherida en toda su superficie al envase que contenga directamente la sustancia. Estas superficies estarán destinadas exclusivamente a contener las informaciones exigidas por el presente Reglamento y en su caso las indicaciones complementarias de higiene o seguridad.

2. La etiqueta no será necesaria cuando las indicaciones previstas en el apartado anterior estén consignadas de forma visible en el propio envase.

3. La presentación y el color de la etiqueta y, en el caso del apartado 2, del envase serán tales que el símbolo de peligro y el fondo sobre el que esté impreso destaquen claramente.

4. La información que con arreglo al artículo 19 deberá contener la etiqueta, destacará sobre el fondo y será de un tamaño suficiente e irá espaciada de forma tal que pueda leerse fácilmente. El anexo VI contiene disposiciones concretas relativas a la presentación y al formato de esa información para determinadas sustancias.

5. Se considerarán cumplidas las exigencias en materia de etiquetado, a los efectos del presente Reglamento:

a) Cuando un embalaje que contenga uno o varios envases interiores, esté etiquetado de acuerdo con las

normas internacionales en materia de transporte de sustancias peligrosas y el envase interior o envases interiores estén etiquetados conforme al presente Reglamento.

b) En el caso de un envase único:

1.° Cuando el mismo lleve una etiqueta conforme a las normas internacionales en materia de transporte de sustancias peligrosas y a los párrafos a), b), d), e), f) y g) del apartado 1 del artículo 19.

2.° Cuando se considere apropiado para tipos especiales de envase, como las bombonas de gas portátiles, de conformidad con las prescripciones específicas contempladas en el anexo VI.

Artículo 21. *Excepciones a los requisitos de etiquetado y envasado.*

1. Los artículos 18, 19 y 20 anteriores no se aplicarán a las disposiciones que regulan las municiones y los explosivos comercializados para producir un efecto práctico pirotécnico o de explosión.

2. Cuando los envases sean muy pequeños o de una forma tal que no permitan la utilización de una etiqueta que pueda cumplir lo determinado en los apartados 1 y 2 del artículo 20, el etiquetado exigido en el artículo 19 se podrá aplicar de otra forma adecuada, siempre que previamente se ponga en conocimiento de la autoridad competente sesenta días antes de su comercialización.

3. Los envases de sustancias peligrosas, que no sean «explosivas», «muy tóxicas» o «tóxicas», podrán eximirse de la obligación de etiquetado o hacerlo de forma distinta a la exigida en los artículos 19 y 20, en el caso de que contengan cantidades tan reducidas que no puedan suponer peligro para las personas que manipulan esas sustancias ni para terceros, siempre que previamente se ponga en conocimiento de la autoridad competente sesenta días antes de su comercialización.

4. Cuando los envases de sustancias, «explosivas», «muy tóxicas» o «tóxicas» sean muy pequeños o de forma tal que no permitan el etiquetado que se establece en los artículos 19 y 20, podrán ser etiquetados de cualquier otra forma apropiada, siempre y cuando no haya peligro para las personas que manipulan dichas sustancias ni para terceros, siempre que previamente se ponga en conocimiento de la autoridad competente sesenta días antes de su comercialización.

En las excepciones mencionadas en los párrafos 2, 3 y 4, no podrán utilizarse símbolos, indicaciones de peligro, frases R o frases S distintas a las que se establecen en el presente Reglamento.

Artículo 22. *Publicidad.*

De acuerdo con lo previsto en el artículo 8 de la Ley 34/1988, de 11 de noviembre, General de Publicidad, y en el artículo 27 de la Ley 14/1986, General de Sanidad, se prohíbe toda publicidad sobre las sustancias incluidas en una o en varias de las categorías contempladas en el apartado 2 del artículo 2 cuando en ella no se mencionen la categoría o categorías de que se trate.

Artículo 23. *Ficha de datos de seguridad.*

1. Con el fin de adoptar un sistema de información dirigido principalmente a los usuarios profesionales que les permita tomar las medidas necesarias para la protección de la salud y de la seguridad en el lugar del trabajo, el responsable de la comercialización de una sustancia peligrosa deberá disponer de una ficha de datos de seguridad en el momento de la comercialización. Una copia de la misma se entregará al Ministerio de Sanidad y Consumo, que la mantendrá a disposición de las Comunidades Autónomas que lo soliciten.

Dicha ficha podrá ser comunicada en papel o de forma electrónica.

El responsable de la comercialización de una sustancia peligrosa, ya se trate del fabricante, del importador o del distribuidor, deberá facilitar al destinatario, que sea un usuario profesional, una ficha de datos de seguridad, en el momento de la primera entrega de la misma o incluso antes, en la que figure la información especificada en el apartado 2 del presente artículo.

Las informaciones se proporcionarán de forma gratuita y nunca más tarde de la primera entrega de la sustancia, y, posteriormente, siempre que se produzcan revisiones originadas por la aparición de nuevos conocimientos significativos relativos a la seguridad y a la protección de la salud y el medio ambiente.

2. La nueva versión fechada, denominada «Revisión ... (fecha)», se proporcionará de forma gratuita a todos los destinatarios anteriores y que hubieran recibido la sustancia en los doce meses precedentes. Igualmente, se remitirá al Ministerio de Sanidad y Consumo.

No será obligatorio proporcionar la ficha de datos de seguridad en caso de que las sustancias peligrosas que se comercialicen vayan acompañadas de la información suficiente con la que el usuario pueda tomar las medidas necesarias en relación con la protección de la salud y la seguridad. Sin embargo, se deberá facilitar la ficha de datos de seguridad si el usuario profesional así lo solicita.

3. La ficha de datos de seguridad mencionada en el apartado 1 anterior deberá redactarse, al menos, en la lengua española oficial del Estado e incluirá obligatoriamente los siguientes epígrafes:

a) Identificación de la sustancia y del responsable de su comercialización.
b) Composición/información sobre los componentes.
c) Identificación de los peligros.
d) Primeros auxilios.
e) Medidas de lucha contra incendios.
f) Medidas que deben tomarse en caso de vertido accidental.
g) Manipulación y almacenamiento.
h) Controles de exposición/protección individual.
i) Propiedades físico-químicas.
j) Estabilidad y reactividad.
k) Informaciones toxicológicas.
l) Informaciones ecológicas.
m) Consideraciones relativas a la eliminación.
n) Informaciones relativas al transporte.
ñ) Informaciones reglamentarias, y
o) Otras informaciones.

El responsable de la comercialización de la sustancia deberá proporcionar las informaciones correspondientes a estos epígrafes, redactándolas conforme a las notas explicativas que figuran en el anexo XI del presente Reglamento. La ficha de datos de seguridad deberá estar fechada.

CAPITULO VIII

Competencias administrativas

Artículo 24. *Determinación competencial.*

1. Competencias de la Administración del Estado.

a) De acuerdo con lo establecido en el artículo 40.1, 5 y 6 de la Ley 14/1986, General de Sanidad, el Ministerio de Sanidad y Consumo será autoridad competente en cuanto se refiere a la determinación y desarrollo de

los requisitos de clasificación, envasado, etiquetado y fichas de datos de seguridad de las sustancias peligrosas; así como de las actuaciones relativas al procedimiento de notificación y evaluación del riesgo de sustancias nuevas y de verificación u homologación de estas sustancias que, en su caso, proceda realizar con carácter previo a su comercialización.

b) En el ejercicio de estas competencias, el Ministerio de Sanidad y Consumo coordinará sus actuaciones con los Ministerios de Trabajo y Seguridad Social, de Industria y Energía y de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, y con los restantes órganos de las Administraciones Públicas, en orden a una correcta aplicación de lo dispuesto en el presente Reglamento. Igualmente, y de acuerdo con lo previsto en el artículo 4.1.c) de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, facilitará a esas autoridades, la información que precisen para el ejercicio de sus funciones.

c) Corresponderá al Ministerio de Sanidad y Consumo el ejercicio de las actividades precisas para el correcto desempeño de las competencias que al mismo corresponde.

2. Competencias de las Comunidades Autónomas.

Corresponderá a los órganos competentes de las Comunidades Autónomas la vigilancia, inspección y control del correcto cumplimiento de cuanto se establece en este Reglamento, con respecto a las sustancias y preparados comercializados en sus respectivos territorios, así como el ejercicio de la potestad sancionadora cuando corresponda.

3. Actuaciones en materia de seguridad e higiene en el trabajo.

Lo establecido en este Reglamento no afectará a la facultad de los organismos competentes en materia de seguridad e higiene en el trabajo, de establecer los requisitos necesarios para garantizar la protección de los trabajadores durante la utilización de las sustancias peligrosas, siempre que ello no suponga modificaciones de la clasificación, el envasado ni el etiquetado de las sustancias peligrosas con respecto a las disposiciones establecidas en el presente Reglamento.

Artículo 25. *Intercambio de información.*

1. El Ministerio de Sanidad y Consumo suministrará a las Comunidades Autónomas los consejos, orientaciones, información o cualquier otro elemento que disponga para que éstas puedan ejercer adecuadamente sus funciones de inspección y vigilancia.

Igualmente podrá poner en práctica las medidas que resulten más adecuadas para lograr la efectiva coordinación de las actuaciones que en esta materia corresponden a las Comunidades Autónomas.

2. Sin perjuicio de las medidas de coordinación y colaboración que se establezcan, las autoridades de las Comunidades Autónomas encargadas del control del correcto cumplimiento de lo establecido en este Reglamento informarán anualmente, al Ministerio de Sanidad y Consumo, de las actividades que realicen para garantizar la aplicación de este Reglamento.

Artículo 26. *Competencias para solicitud de información.*

1. Con el fin de dar respuesta a cualquier solicitud de orden médico el Ministerio de Sanidad y Consumo y los órganos correspondientes de las Comunidades Autónomas podrán solicitar al responsable de la comercialización la información relativa a las sustancias peligrosas comercializadas, incluida su composición química. Igualmente, en caso de urgencia, podrá solicitar esa información cualquier autoridad que deba hacer frente a tal situación. En todo caso se asegurará la confidencialidad de los datos suministrados que tengan tal carácter. Para todo ello, podrán dictarse, en su caso, las disposiciones complementarias que se consideren oportunas.

2. Mediante Real Decreto se establecerá un sistema de información para la prevención y tratamiento de intoxicaciones o accidentes ocasionados por sustancias peligrosas.

Artículo 27. *Cláusula de salvaguardia.*

1. Cuando el Ministerio de Sanidad y Consumo tenga pruebas evidentes de que una sustancia puesta en el mercado, aun cumpliendo los requisitos de este Reglamento, constituya un peligro para la salud o para el medio ambiente por motivos de su clasificación, envasado o etiquetado, podrá someterla a condiciones especiales de control, proceder a una nueva clasificación provisional de dicha sustancia o, si fuera necesario, prohibir la comercialización de la misma. El Ministerio de Sanidad y Consumo informará inmediatamente a la Unión Europea y a los demás Estados miembros, indicando los motivos que hayan justificado tal decisión.

2. El Ministerio de Sanidad y Consumo comunicará al fabricante o responsable de la comercialización de la sustancia las medidas adoptadas en ejercicio de las funciones atribuidas en el apartado anterior.

CAPITULO IX

Infracciones y sanciones

Artículo 28. *Aplicación en esta materia del régimen sancionador legalmente establecido.*

1. Las infracciones cometidas contra lo dispuesto en el presente Real Decreto tendrán el carácter de infracciones administrativas a la normativa sanitaria, de conformidad con lo dispuesto en el capítulo VI, del Título I, de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, y de las restantes disposiciones que resulten de aplicación. Las sanciones correspondientes se impondrán previa instrucción del correspondiente expediente, de acuerdo con lo previsto en la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, del Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, y en el Real Decreto 1398/1993, de 4 de agosto, por el que se aprueba el Reglamento del procedimiento para el ejercicio de la potestad sancionadora. Todo ello sin perjuicio de las responsabilidades civiles, penales o de otro orden que pudieran concurrir.

2. Se considerarán infracciones leves:

El incumplimiento de lo establecido en el presente Real Decreto, o en las disposiciones que lo desarrollen, en cuanto que no sea clasificado como falta grave o muy grave, según preceptúa el artículo 35-A-3.ª de la Ley General de Sanidad.

3. Se considerarán infracciones graves:

a) El incumplimiento de la obligación de facilitar o bien suministrar falsa o inexacta, a la autoridad competente, la información exigible en relación con el procedimiento de notificación, según preceptúa el artículo 35-B-4.ª y 5.ª de la Ley General de Sanidad.

b) El incumplimiento de los requisitos de clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias, considerado como supuesto de los previstos en el artículo 35-B-1.ª y 4.ª de la Ley General de Sanidad.

c) La ausencia de alguno de los datos exigidos en la ficha de datos de seguridad, como supuesto de los previstos en el artículo 35-B-1.ª y 2.ª de la Ley General de Sanidad.

d) La reincidencia en la comisión de infracciones leves en los últimos 3 meses, según lo previsto en el artículo 35-B-7.ªde la Ley General de Sanidad.

4. Se considerarán infracciones muy graves:

a) La comercialización de una sustancia nueva sin la previa notificación de la misma, considerado como supuesto de los previstos en el artículo 35-C-1.ª y 2.ª de la Ley General de Sanidad.

b) La no comunicación a la autoridad competente del aumento de las cantidades de sustancias comercializadas, distintas a la notificación inicial, considerado como supuesto de los previstos en el artículo 35-C-1.ª y 2.ª de la Ley General de Sanidad.

c) La comercialización de sustancias peligrosas sin la ficha de datos de seguridad, considerado como supuesto de los previstos en el artículo 35-C-1.ª y 2.ª de la Ley General de Sanidad.

d) El incumplimiento consciente y deliberado de los requisitos de clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias, cuando el mismo suponga un riesgo grave para la salud pública y el medio ambiente, considerado como supuesto de los previstos en el artículo 35-C-1.ª y 2.ª de la Ley General de Sanidad.

e) La reincidencia en la comisión de faltas graves en los últimos cinco años, según preceptúa el artículo 35-C-8.ª de la Ley General de Sanidad.

5. Las infracciones descritas en los apartados anteriores darán lugar a la imposición de las sanciones previstas en el artículo 36 de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.

6. Para la imposición de las sanciones que correspondan se tendrá en consideración el grado de dolo o culpa existente, así como su incidencia en la salud pública y medio ambiente y su trascendencia económica.

7. De conformidad con lo dispuesto en el artículo 33 de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, estas sanciones serán independientes de las que puedan imponerse por otras autoridades competentes en base a fundamentos distintos a los de infracción a la normativa sanitaria.

A tal efecto, las distintas autoridades intercambiarán los antecedentes e informaciones que obren en su poder.

PROLOGO AL ANEXO I

Introducción

El anexo I constituye un índice de sustancias peligrosas para las que existe un sistema armonizado de clasificación y etiquetado, acordado a nivel de la Comunidad de conformidad con el procedimiento establecido en el apartado 3 del artículo 4 de la Directiva 67/548/CEE.

Numeración de las sustancias

En el anexo I las sustancias están clasificadas por el número atómico del elemento más característico de sus propiedades. En el cuadro A figura una lista de elementos químicos clasificados por su número atómico. Dada su variedad, las sustancias orgánicas se han clasificado de la forma habitual, como aparece en el cuadro B.

El número de clasificación de cada sustancia consiste en una secuencia de cifras del tipo ABC-RST-VW-Y, donde:

ABC: representa, bien el número atómico del elemento químico más característico (precedido de uno o dos ceros, para completar la secuencia), bien el número convencional de la clasificación de sustancias orgánicas;

RST: representa el número consecutivo de la sustancia en la serie ABC;

VW: representa la forma en que la sustancia se produce o se comercializa; finalmente,

Y: representa la cifra de control calculada de acuerdo con el método ISBN (International Standard Book Number).

Por ejemplo, el número atómico de clasificación del cloruro sódico es 017-005-00-9.

Las sustancias peligrosas incluidas en el inventario europeo de sustancias químicas comercializadas (EINECS, DO número C, 146 A, de 15 de junio de 1990) llevan también su número EINECS. Se trata de un número de siete dígitos del tipo XXX-XXX-X que comienza por el 200-001-8.

En el caso de sustancias peligrosas notificadas conforme a lo dispuesto en el presente Reglamento se incluye el número de la sustancia en la lista europea de sustancias notificadas (ELINCS).

Este es un número de siete dígitos del tipo XXX-XXX-X que comienza por el 400-010-9.

Se incluye también el número CAS (Chemical Abstracts Service) para facilitar la identificación de la sustancia. Nótese que el número EINECS incluye la forma anhidra y la forma hidratada de una sustancia, mientras que el número CAS de ambas formas suele ser distinto. En todos los casos se incluye solamente el número CAS de la forma anhidra, de modo que el número CAS que aparece no describe la sustancia con la misma precisión que el número EINECS.

Por lo general, los números EINECS, ELINCS y CAS no se incluyen en el caso de grupos que comprenden más de tres sustancias distintas.

En el caso de sustancias bien definidas se representa también su estructura, para facilitar la identificación.

Nomenclatura

Siempre que ello es posible, las sustancias peligrosas se designan por sus nombres EINECS o ELINCS. Las demás sustancias que no aparecen en las listas EINECS o ELINCS se designan empleando una denominación química reconocida internacionalmente (por ejemplo, ISO o IUPAC). En algunos casos se añade, además, una denominación común.

Normalmente, no se mencionan las impurezas, los aditivos ni los componentes presentes en menor cuantía, salvo que sean significativos para la clasificación de la sustancia.

Algunas sustancias se describen como «mezcla de A y B». Estas entradas se refieren a una mezcla específica. En determinados casos, cuando es necesario caracterizar la sustancia comercializada, se especifican las proporciones de las principales sustancias de la mezcla.

Algunas sustancias se describen con un porcentaje específico de pureza. Las sustancias cuyo contenido de material activo es mayor (por ejemplo, un peróxido orgánico) no se incluyen en la entrada del anexo I, y pueden presentar otras propiedades peligrosas (por ejemplo, ser explosivas). Allí donde figuran límites específicos de la concentración, éstos se aplican a la sustancia o las sustancias que aparecen en la entrada. En particular, en el caso de entradas que son mezclas de sustancias o bien sustancias descritas con un porcentaje específico

de pureza, los límites se aplican a la sustancia tal y como se describe en el anexo I y no a la sustancia pura.

Formato de las entradas

En relación con cada una de las sustancias del anexo I aparece la información siguiente:

a) Clasificación:

i) La clasificación consiste en incluir una sustancia en una categoría de peligro según las definiciones del apartado 2 del artículo 2 del presente Reglamento y en asignarle la frase o frases de riesgo. La clasificación tiene consecuencias no sólo para el etiquetado, sino también para otras medidas legislativas y reglamentarias relacionadas con sustancias peligrosas.

ii) La clasificación en cada categoría de peligro aparece en cuadros separados. Cada cuadro incluye, en general, una descripción de la categoría del peligro y una o más frases de riesgo. Sin embargo, en algunos casos (cuando se trata de sustancias clasificadas como inflamables o sensibilizantes, o en el caso de sustancias clasificadas como peligrosas para el medio ambiente) solamente aparece la frase o frases de riesgo, dado que dicha información ya es suficiente.

iii) Se indica a continuación la descripción de las categorías de peligro:

explosivo: E
comburente: O
extremadamente inflamable: F+
fácilmente inflamable: F
inflamable: R10
muy tóxico: T+
tóxico: T
nocivo: Xn
corrosivo: C
irritante: Xi
sensibilizante: R42 y/o R43
carcinogénico: Carc. Cat. (1)
mutagénico: Mut. Cat. (1)
tóxico para la reproducción: Repr. Cat. (1)
peligroso para el medio ambiente: N o R52, R53, R59.

iv) En cuadros aparte aparecen frases adicionales referentes al riesgo, asignadas para describir otras propiedades (véanse los apartados 2.2.6 y 3.2.8 de la guía del etiquetado).

b) La etiqueta que incluye:

i) el símbolo o símbolos, cuando hayan sido asignados, y las indicaciones de peligro asignadas a la sustancia de conformidad con el anexo II [véase la letra c) del apartado 1 del artículo 19];

ii) las frases de riesgo, denotadas por una serie de números precedidos de la letra R, que indican la naturaleza de los riesgos especiales, de conformidad con el anexo II [véase la letra d) del apartado 1 del artículo 19]. Los números se separan, bien mediante un guión (-), que indica afirmaciones, independientes, referidas a riesgos especiales (R), o bien mediante una barra inclinada (/), que indica una afirmación combinada, en una única frase, de los riesgos especiales, tal y como se expone en el anexo III;

iii) las frases de prudencia, denotadas por una serie de números precedidos de la letra S, que indican las precauciones de seguridad recomendadas, conforme al anexo IV [véase la letra e) del apartado 1 del artículo 19]. Una vez más, los números van separados, bien por un guión bien por una barra inclinada, cuyo significado es el mismo que en el inciso ii), salvo que las afirmaciones combinadas de precauciones de seguridad recomendadas aparecen en el anexo IV. Las frases de prudencia que se indican sólo se refieren a las sustancias; para los preparados, las frases se eligen de acuerdo con las normas habituales.

Nótese que, en el caso de determinadas sustancias y preparados peligrosos vendidos al público en general, hay frases S obligatorias.

Las frases S1, S2 y S45 son obligatorias para todas las sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y corrosivos vendidos al público en general.

Las frases S2 y S46 son obligatorias para todas las demás sustancias y preparados peligrosos vendidos al público en general que no se han clasificado únicamente como «peligrosas para el medio ambiente».

Las frases S1 y S2 figuran entre paréntesis en el anexo I y solamente pueden omitirse en la etiqueta si la sustancia o el preparado se venden exclusivamente para uso industrial.

c) Los límites de concentración y las clasificaciones toxicológicas asociadas necesarias para clasificar los preparados peligrosos que contienen la sustancia de conformidad con el Reglamento sobre Clasificación, Envasado y Etiquetado de Preparados Peligrosos.

A menos que se indique lo contrario, los límites de concentración están expresados como el porcentaje en peso de la sustancia respecto al peso total de preparado.

Cuando no se den límites de concentración, los límites de concentración que deberán emplearse al aplicar el método convencional para evaluar los riesgos para la salud son los que figuran en el anexo I del citado Reglamento de Preparados Peligrosos.

Notas explicativas generales

Grupos de sustancias.

En el anexo I se incluye una serie de entradas colectivas. En estos casos, los requisitos de clasificación y etiquetado se aplicarán a todas las sustancias comercializadas cubiertas por la descripción en la medida en que aparezcan en la lista EINECS o ELINCS. Cuando una sustancia incluida en una entrada colectiva constituya una impureza de otra sustancia, los requisitos de clasificación y etiquetado descritos en la entrada colectiva se tendrán en cuenta al etiquetar las sustancias.

En algunos casos hay requisitos de clasificación y etiquetado para sustancias específicas cubiertas por una entrada colectiva. En tales casos, en el anexo I se incluirá una entrada específica para la sustancia, y la entrada de grupo llevará la anotación «salvo las excepciones indicadas en otro lugar».

Las entradas del anexo I referentes a las sales (bajo cualquier denominación) cubren las formas anhidras y las hidratadas, a menos que se diga expresamente lo contrario.

Sustancias con número ELINCS.

En el anexo I las sustancias con número ELINCS han sido notificadas con conformidad con el presente Reglamento. El productor o importador que no haya notificado previamente estas sustancias debe referirse a las previsiones de este Reglamento si tiene la intención de comercializar dichas sustancias.

(1) Se indica, según proceda, la categoría de carcinogénico, mutagénico o tóxico para la reproducción (es decir, 1, 2 ó 3).

Explicación de las notas relacionadas con la identificación y el etiquetado de las sustancias

El significado de las notas que aparecen bajo el número de índice es el siguiente:

Nota A:

El nombre de la sustancia debe figurar en la etiqueta bajo una de las denominaciones que figuren en el anexo I de la presente Directiva [véase la letra a) del apartado 2 del artículo 23].

En el anexo I se emplea a veces una denominación general del tipo: «compuesto de...» o «sal de...». En este caso, el fabricante o cualquier otra persona que ponga en el mercado tal sustancia estará obligado a precisar en la etiqueta el nombre químico correcto.

Ejemplo: para $BeCl_2$: cloruro de berilio

Nota B:

Ciertas sustancias (ácidos, bases, etc.) se introducen en el mercado en forma de solución acuosa de concentraciones diversas y necesitan por ello un etiquetado diferente, pues los riesgos que presentan dependen de la concentración.

En el anexo I se emplea una denominación general del tipo:

«ácido nítrico ... %».

En tal caso, el fabricante o cualquier otra persona que ponga en el mercado la sustancia deberá indicar en la etiqueta la concentración de la solución en %.

Ejemplo: ácido nítrico 45%.

La expresión en «%» se entenderá siempre como peso/peso, excepto si explícitamente se especifica otra cosa.

Se permitirá la utilización de datos suplementarios (por ejemplo, peso específico o grado Baumé) o de frases descriptivas (por ejemplo, fumante o glacial).

Nota C:

Entre las sustancias orgánicas, algunas pueden encontrarse en el mercado, bien en una forma isomérica bien definida, bien en forma de mezcla de varios isómeros.

En el anexo I se emplea a veces una denominación general del tipo:

«xilenol».

En tal caso, el fabricante o cualquier otra persona que ponga en el mercado la sustancia deberá especificar en la etiqueta si se trata: a) de un isómero bien definido, o b) de una mezcla de isómeros.

Ejemplos:

a) 2,4-dimetilfenol,

b) xilenol (mezcla de isómeros).

Nota D:

Ciertas sustancias susceptibles de experimentar una descomposición o polimerización espontáneas se ponen en el mercado de forma estabilizada y así figuran en el anexo I del presente Reglamento.

No obstante, en algunas ocasiones, dichas sustancias se ponen en el mercado de forma no estabilizada. En tal caso, el fabricante o cualquier otra persona que ponga en el mercado la sustancia deberá precisar en la etiqueta el nombre de la sustancia seguido de la expresión «no estabilizado».

Ejemplo: ácido metracrílico (no estabilizado).

Nota E:

A las sustancias con efectos específicos sobre la salud humana (véase el capítulo 4 del anexo VI) que se clasifican como carcinogénicas, mutagénicas y/o tóxicas para la reproducción en las categorías 1 ó 2 se les adscribe la nota E si están también clasificadas como muy tóxicas (T+), tóxicas (T) o nocivas (Xn). En el caso de estas sustancias, las frases de riesgo R20, R21, R22, R23, R24, R25, R26, R27, R28, R39, R40 y R48, así como todas las combinaciones de estas frases de riesgo irán precedidas de la palabra «también».

Ejemplos:

R45-23: «Puede causar cáncer. También tóxico por inhalación».

R46-27/28: «Puede causar daños genéticos hereditarios. También muy tóxicos en contacto con la piel y por ingestión».

Nota F:

Esta sustancia puede contener un estabilizante. Si el estabilizante cambia las propiedades peligrosas de la sustancia según se indican en la etiqueta del anexo I, la etiqueta deberá redactarse siguiendo las reglas de etiquetado de los preparados peligrosos.

Nota G:

Esta sustancia puede ser puesta en el mercado en forma de explosivo, en cuyo caso debe ser evaluada utilizando los métodos de ensayo apropiados y suministrarse provista de una etiqueta que refleje sus propiedades explosivas.

Explicación de las notas relacionadas con el etiquetado de los preparados

El significado de las notas que aparecen junto a los límites de concentración es el siguiente:

Nota 1:

La concentración señalada es el porcentaje en peso del elemento metálico, calculado con respecto al peso total del preparado.

Nota 2:

La concentración de isocianato señalada es el porcentaje en peso del monómero libre, calculado con respecto al peso total del preparado.

Nota 3:

La concentración señalada es el porcentaje en peso de los iones cromato disueltos en agua, calculado con respecto al peso total del preparado.

TABLA A

Lista de los elementos químicos clasificados por su número atómico (Z)

Z	Símb.	Elemento químico	Z	Símbolo	Elemento químico
1	H	Hidrógeno	53	I	Yodo
2	He	Helio	54	Xe	Xenón
3	Li	Litio	55	Cs	Cesio
4	Be	Berilio	56	Ba	Bario
5	B	Boro	57	La	Lantano
6	C	Carbono	58	Ce	Cerio
7	N	Nitrógeno	59	Pr	Praseodimio
8	O	Oxígeno	60	Nd	Niodimio
9	F	Flúor	61	Pm	Prometio
10	Ne	Neón	62	Sm	Samario
11	Na	Sodio	63	Eu	Europio
12	Mg	Magnesio	64	Gd	Gadolinio
13	Al	Aluminio	65	Tb	Terbio
14	Si	Silicio	66	Dy	Disprosio
15	P	Fósforo	67	Ho	Holmio
16	S	Azúfre	68	Er	Herbio
17	Cl	Cloro	69	Tm	Tulio
18	A	Argón	70	Yt	Iterbio
19	K	Potasio	71	Lu	Lutecio
20	Ca	Calcio	72	Hf	Hafnio
21	Sc	Escandio	73	Ta	Tántalo
22	Ti	Titanio	74	W	Volframio
23	V	Vanadio	75	Re	Renio
24	Cr	Cromo	76	Os	Osmio
25	Mn	Manganeso	77	Ir	Iridio
26	Fe	Hierro	78	Pt	Platino
27	Co	Cobalto	79	Au	Oro
28	Ni	Níquel	80	Hg	Mercurio
29	Cu	Cobre	81	Tl	Talio
30	Zn	Zinc	82	Pb	Plomo
31	Ga	Galio	83	Bi	Bismuto
32	Ge	Germanio	84	Po	Polonio
33	As	Arsénico	85	At	Astato
34	Se	Selenio	86	Rn	Radón
35	Br	Bromo	87	Fr	Francio
36	Kr	Kriptón	88	Ra	Radio
37	Rb	Rubidio	89	Ac	Actinio
38	Sr	Estroncio	90	Th	Torio
39	Y	Itrio	91	Pa	Protactinio
40	Zr	Zirconio	92	U	Uranio
41	Nb	Niobio	93	Np	Neptunio
42	Mo	Molibdeno	94	Pu	Plutonio
43	Tc	Tecnecio	95	Am	Americio
44	Ru	Rutenio	96	Cm	Curio
45	Rh	Rodio	97	Bk	Berkelio
46	Pd	Paladio	98	Cf	Californio
47	Ag	Plata	99	Es	Einstenio
48	Cd	Cadmio	100	Fm	Fermio
49	In	Indio	101	Md	Mendelebio
50	Sn	Estaño	102	No	Nobelio
51	Sb	Antimonio	103	Lw	Laurencio
52	Te	Telurio			

TABLA B

Clasificación especial para las sustancias orgánicas

601 Hidrocarburos
602 Hidrocarburos halogenados
603 Alcoholes y derivados
604 Fenoles y derivados
605 Aldehídos y derivados
606 Cetonas y derivados
607 Acidos orgánicos y derivados
608 Nitrilos
609 Derivados nitrados
610 Derivados cloronitrados
611 Derivados azoicos y azoxi
612 Derivados aminados
613 Bases heterocíclicas y derivados
614 Glucósidos y alcaloides
615 Cianatos e isocianatos
616 Amidas y derivados
617 Peróxidos orgánicos
648 Sustancias complejas derivadas del carbono
649 Sustancias complejas derivadas del petróleo
650 Sustancias diversas

Cas No 1333-74-0 | EEC No 215-605-7 | No 001-001-00-9

H_2

hidrógeno

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 16853-85-3 | EEC No 240-877-9 | No 001-002-00-4

$LiAlH_4$

hidruro de litio y de aluminio

Clasificación,

F ; R 15

Etiquetado,

F

R : 15

S : (2-)7/8-24/25-43

Límites de concentración,

Cas No 7646-69-7 | EEC No 231-587-3 | No 001-003-00-X

NaH

hidruro de sodio

Clasificación,

F ; R 15

Etiquetado,

F

R : 15

S : (2-)7/8-24/25-43

Límites de concentración,

Cas No 7789-78-8 | EEC No 232-189-2 | No 001-004-00-5

CaH_2

hidruro de calcio

Clasificación,

F ; R 15

Etiquetado,

F

R : 15

S : (2-)7/8-24/25-43

Límites de concentración,

Cas No 7439-93-2	EEC No 231-102-5	No 003-001-00-4

Li

litio

Clasificación,

F; R 14/15	C; R 34

Etiquetado,

F C

R: 14/15-34

S: (1/2-)8-43-45

Límites de concentración,

Cas No 7440-41-7	EEC No 231-150-7	No 004-001-00-7

NOTA E

Be

berilio

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 49	T+; R 26	T; R 25-48/23	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado,

T+

R: 49-25-26-36/37/38-43-48/23

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 004-002-00-2

NOTA A

NOTA E

compuestos de berilio, excepto los silicatos dobles de aluminio y berilio

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 49	T+; R 26	T; R 25-48/23	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado,

T+

R: 49-25-26-36/37/38-43-48/23

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7637-07-2	EEC No 231-569-5	No 005-001-00-X

BF_3

trifluoruro de boro

Clasificación,

R 14	T+; R 26	C; R 35

Etiquetado,

T+ C

R: 14-26-35

S: (1/2-)9-26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 10294-34-5	EEC No 233-658-4	No 005-002-00-5

BCl_3

tricloruro de boro

Clasificación,

R 14	T+ ; R 26/28	C ; R 34

Etiquetado,

T+

R : 14-26/28-34

S : (1/2-)9-26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 10294-33-4	EEC No 233-657-9	No 005-003-00-0

BBr_3

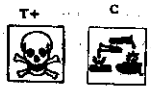
tribromuro de boro

Clasificación,

R 14	T+ ; R 26/28	C ; R 35

Etiquetado,

T+ C



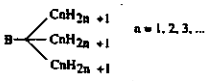
R : 14-26/28-35

S : (1/2-)9-26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 005-004-00-6

NOTA A



trialquilboranos

Clasificación,

F ; R 17	C ; R 34

Etiquetado,

F C

R : 17-34

S : (1/2-)7-23-26-36/37/39-43-45

Límites de concentración,

Cas No 121-43-7	EEC No 204-468-9	No 005-005-00-1

borato de trimetilo

Clasificación,

R 10	Xn ; R 21

Etiquetado,

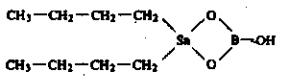
Xn

R : 10-21

S : (2-)23-25

Límites de concentración,

Cas No 75113-37-0	EEC No 401-040-5	No 005-006-00-7



hidrogenoborato de dibutilestaño

Clasificación,

T; R 48/25	Xn; R 21/22	Xi; R 41	R 43	N; R 50-53

Etiquetado,

T N

R: 21/22-41-43-48/25-50/53

S: (1/2-)22-26-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 630-08-0	EEC No 211-128-3	No 006-001-00-2

CO

monóxido de carbono

Clasificación,

F+; R 12	T; R 23

Etiquetado,

F+ T

R: 12-23

S: (1/2-)7-16-45

Límites de concentración,

Cas No 75-44-5	EEC No 200-870-3	No 006-002-00-8

$COCl_2$

dicloruro de carbonilo; fosgeno

Clasificación,

T+; R 26

Etiquetado,

T+

R: 26

S: (1/2-)7/9-24/25-45

Límites de concentración,

Cas No 75-15-0	EEC No 200-843-6	No 006-003-00-3

CS_2

disulfuro de carbono

Clasificación,

F; R 11	Repr. Cat. 3; R 62-63	T; R 48/23	Xi; R 36/38

Etiquetado,

F T

R: 11-36/38-48/23-62-63

S: 16-33-36/37-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T; R 36/38-48/23-62-63
1 % ≤ C < 20 %	T; R 48/23-62-63
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn; R 48/20

Cas No 75-20-7 | EEC No 200-848-3 | No 006-004-00-9

CaC_2

carburo de calcio

Clasificación,

F; R 15

Etiquetado,

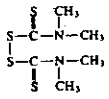
F

R: 15

S: (2-)8-43

Límites de concentración,

Cas No 137-26-8 | EEC No 205-286-2 | No 006-005-00-4



tiram; disulfuro de bis (N,N-dimetiltiocarbamilo)

Clasificación,

Muta. Cat. 3; R 40	Xn; R 20/22	Xi; R 36/37	R 43

Etiquetado,

Xn

R: 20/22-36/37-40-43

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 74-90-8 | EEC No 200-821-6 | No 006-006-00-X

HCN

ácido cianhídrico; cianuro de hidrógeno

Clasificación,

F+; R 12	T+; R 26

Etiquetado,

F+ T+

R: 12-26

S: (1/2-)7/9-16-36/37-38-45

Límites de concentración,

Cas No 74-90-8 | EEC No 200-821-6 | No 006-006-01-7

NOTA B

HCN .... %

ácido cianhídrico; cianuro de hidrógeno .... %

Clasificación,

T+; R 26/27/28

Etiquetado,

T+

R: 26/27/28

S: (1/2-)7/9-16-36/37-38-45

Límites de concentración,

C ≥ 7 %	T+; R 26/27/28
1 % ≤ C < 7 %	T; R 23/24/25
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —

EEC No —

No 006-007-00-5

NOTA A

sales del ácido cianhídrico, excepto los cianuros complejos, tales como los ferrocianuros y ferricianuros y oxicianuro de mercurio

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	R 32

Etiquetado,

T+

R : 26/27/28-32

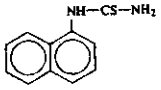
S : (1/2-)7-28-29-45

Límites de concentración,

Cas No 86-88-4

EEC No 201-706-3

No 006-008-00-0



antu (ISO) ; 1-(1-naftil)-2-tiourea

Clasificación,

T+ ; R 28	Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

T+

R : 28-40

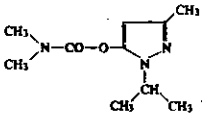
S : (1/2-)25-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 119-38-0

EEC No 204-318-2

No 006-009-00-6



dimetilcarbamato de 1-isopropil-3-metilpirazon-5-ilo ; isolan

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

T+

R : 27/28

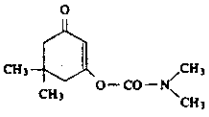
S : (1/2-)28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 122-15-6

EEC No 204-525-8

No 006-010-00-1



dimetilcarbamato de 5,5-dimetil-3-oxociclohex-1-enilo dimetilcarbamato de 5,5-dimetildihidroresorcinol

Clasificación,

T ; R 25

Etiquetado,

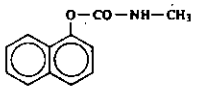
T

R : 25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 63-25-2	EEC No 200-555-0	No 006-011-00-7



carbaril (ISO); carbarilo (DCI); metilcarbamato de 1-naftilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

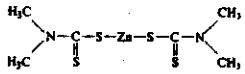
Xn

R: 22

S: (2-)22-24

Límites de concentración,

Cas No 137-30-4	EEC No 205-288-3	No 006-012-00-2



ziram; bis (N,N-dimetilditiocarbamato) de cinc

Clasificación,

Muta. Cat. 3; R 40	Xn; R 22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

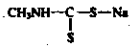
Xn

R: 22-36/37/38-40

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 137-42-8	EEC No 205-293-0	No 006-013-00-8



metam-sodio; N-metilditiocarbamato de sodio

Clasificación,

Xn; R 21/22	R 31	Xi; R 41

Etiquetado,

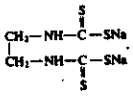
Xn

R: 21/22-31-41

S: (2-)26-36/37/39

Límites de concentración,

Cas No 142-59-6	EEC No 205-547-0	No 006-014-00-3



nabam (ISO); etilenbisditiocarbamato de disodio

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 38

Etiquetado,

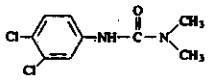
Xn

R: 22-38

S: (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 330-54-1 | EEC No 206-354-4 | No 006-015-00-9



diuron ; 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea

Clasificación,

Xn ; R 48/22

Etiquetado,

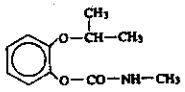
Xn

R : 48/22

S : (2-)22-37

Límites de concentración,

Cas No 114-26-1 | EEC No 204-043-8 | No 006-016-00-4



propoxur (ISO) ; metilcarbamato de 2-isopropoxifenilo

Clasificación,

T ; R 25

Etiquetado,

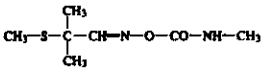
T

R : 25

S : (1/2-)37-45

Límites de concentración,

Cas No 116-06-3 | EEC No 204-123-2 | No 006-017-00-X



aldicarb (ISO) ; 2-metil-2-(metiltio)propionaldehido-O-(metilcarbamoil)oxima

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

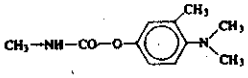
T+

R : 27/28

S : (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2032-59-9 | EEC No 217-990-7 | No 006-018-00-5



aminocarb (ISO) ; metilcarbamato de 4-dimetilamino-m-tolilo

Clasificación,

T ; R 24/25

Etiquetado,

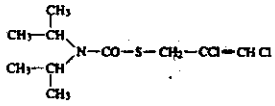
T

R : 24/25

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2303-16-4 | EEC No 218-961-1 | No 006-019-00-0



dialato (ISO); diisopropiltiocarbamato de S-2,3-dicloroalilo

Clasificación,

Xn; R 22 | Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

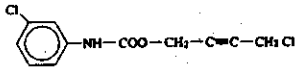
Xn

R: 22-40

S: (2-)25-36/37

Límites de concentración,

Cas No 101-27-9 | EEC No 202-930-4 | No 006-020-00-6



barban (ISO); 3-clorofenilcarbamato de 4-clorobut-2-inilo

Clasificación,

Xn; R 22 | R 43

Etiquetado,

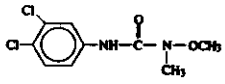
Xn

R: 22-43

S: (2-)24-36/37

Límites de concentración,

Cas No 330-55-2 | EEC No 206-356-5 | No 006-021-00-1



linuron (ISO); 3-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1-metoxiurea

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

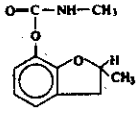
Xn

R: 40

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 1563-67-3 | EEC No — | No 006-022-00-7



decarbofurano; N-metilcarbamato de 2,3-dihidro-2-metil-7-benzofuranilo

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

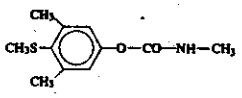
T

R: 23/24/25

S: (1/2-)13-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2032-65-7 | EEC No 217-991-2 | No 006-023-00-2



mercaptodímetur (ISO); metiocarb; metilcarbamato de 4-metiltio-3,5-xililo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

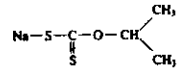
T

R: 25

S: (1/2-)22-37-45

Límites de concentración,

Cas No 140-93-2 | EEC No 205-443-5 | No 006-024-00-8



proxan-sodio; ditiocarbamato de O-isopropilo y de sodio

Clasificación,

Xn; R 22 | Xi; R 38

Etiquetado,

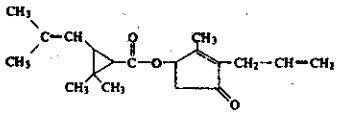
Xn

R: 22-38

S: (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 584-79-2 | EEC No 209-542-4 | No 006-025-00-3



aletrina (ISO); (+-)-cis-trans-crisantemato de (+-)-3-alil-2-metil-4-oxociclopent-2-enilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

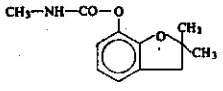
Xn

R: 22

S: (2-)36

Límites de concentración,

Cas No 1563-66-2 | EEC No 216-353-0 | No 006-026-00-9



carbofuran (ISO); metilcarbamato de 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilo

Clasificación,

T+; R 26/28

Etiquetado,

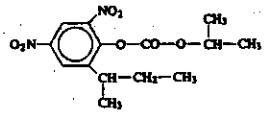
T+

R: 26/28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 973-21-7 | EEC No 213-546-1 | No 006-028-00-X



dinobuton (ISO); carbonato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo y de isopropilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

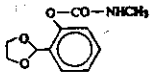
T

R: 25

S: (1/2-)37-45

Límites de concentración,

Cas No 6988-21-2 | EEC No 230-253-4 | No 006-029-00-5



dioxacarb (ISO); metilcarbamato de 2-(1,3-dioxolano-2-il)fenilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

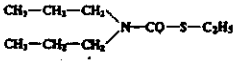
T

R: 25

S: (1/2-)37-45

Límites de concentración,

Cas No 759-94-4 | EEC No 212-073-8 | No 006-030-00-0



EPTC (ISO); dipropiltiocarbamato de S-etilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

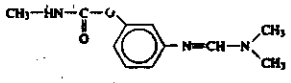
Xn

R: 22

S: (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 22259-30-9 | EEC No 244-879-0 | No 006-031-00-6



formetanato; N-metilcarbamato de 3-(dimetilamino-metilen-amino) fenilo

Clasificación,

T+; R 28

Etiquetado,

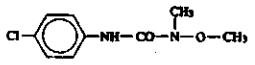
T+

R: 28

S: (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 1746-81-2 | EEC No 217-129-5 | No 006-032-00-1



monolinuron (ISO); 3-(4-clorofenil)-1-metoxi-1-metilurea

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

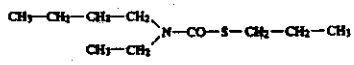
Xn

R: 22

S: (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 1114-71-2 | EEC No 214-215-4 | No 006-034-00-2



pebulato (ISO); butil (etil)tiocarbamato de S-propilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

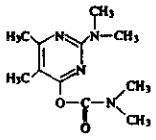
Xn

R: 22

S: (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 23103-98-2 | EEC No 245-430-1 | No 006-035-00-8



pirimicarb; N,N-dimetilcarbamato de 2-dimetilamino-5,6-4-dimetilpirimidinilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

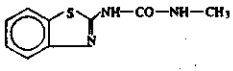
T

R: 25

S: (1/2-)22-57-45

Límites de concentración,

Cas No 1929-88-0 | EEC No 217-685-9 | No 006-036-00-3



benzotiazuron (ISO); 1-benzotiazol-2-il-3-metilurea

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

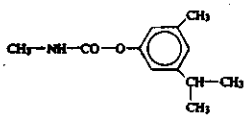
Xn

R: 22

S: (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No 2631-37-0 | EEC No 220-113-0 | No 006-037-00-9



promecarb (ISO); metilcarbamato de 5-isopropil-3-tolilo; metilcarbamato de 5-metil-m-cumenilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

T

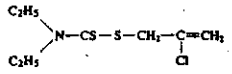
R: 25

S: (1/2-)24-37-45

Límites de concentración,

Cas No 95-06-7 | EEC No 202-388-9 | No 006-038-00-4

NOTA E



sulfalate (ISO); dietilditiocarbamato de 2-cloroalilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45 | Xn; R 22

Etiquetado,

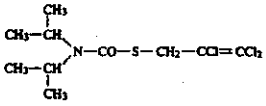
T

R: 45-22

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 2303-17-5 | EEC No 218-962-7 | No 006-039-00-X



trialate (ISO); diisopropiltiocarbamato de S-2,3,3-tricloroalilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

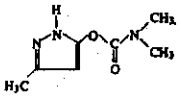
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 2532-43-6 | EEC No — | No 006-040-00-5



N,N-dimetilcarbamato de 3-metil-5-pirazolilo

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

T

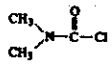
R: 23/24/25

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 79-44-7	EEC No 201-208-6	No 006-041-00-0

NOTA E



cloruro de dimetilcarbamoilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	T ; R 23	Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

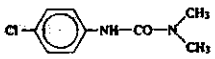
T

R : 45-22-23-36/37/38

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 150-68-5	EEC No 205-766-1	No 006-042-00-6



monuron (ISO) ; 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetilurea

Clasificación,

Xn ; R 22	Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

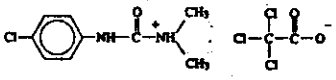
Xn

R : 22-40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 140-41-0	EEC No —	No 006-043-00-1



tricloroacetato de 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetiluronio ; monuron-TCA

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xi ; R 36/38

Etiquetado,

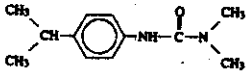
Xn

R : 36/38-40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 34123-59-6	EEC No 251-835-4	No 006-044-00-7



isoproturon ; 3-(4-isopropilfenil)-1,1-dimetilurea

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 22

Etiquetado,

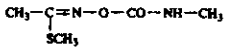
Xn

R : 22-40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 16752-77-5 | EEC No 240-815-0 | No 006-045-00-2



metomil ; metilcarbamato de metiltio-1-etilidenamino

Clasificación,

T+ ; R 28

Etiquetado,

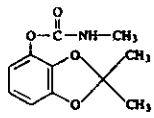
T+

R : 28

S : (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 22781-23-3 | EEC No 245-216-8 | No 006-046-00-8



bendiocarb (ISO) ; metilcarbamato de 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ilo

Clasificación,

T ; R 25 | Xn ; R 21

Etiquetado,

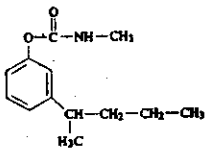
T

R : 21-25

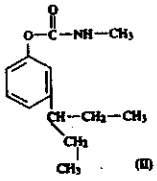
S : (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 8065-36-9 | EEC No — | No 006-047-00-3



(I)



(II)

bufencarb ; metilcarbamato de 3-(pent-2-il)fenilo—metilcarbamato de 3-(pent-3-il)fenilo (3 :1), conteniendo 35 % de una mezcla de isómeros 2- y 4

Clasificación,

T ; R 24/25

Etiquetado,

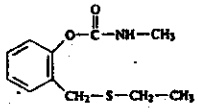
T

R : 24/25

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 29973-13-5 | EEC No 249-981-9 | No 006-048-00-9



etiofencarb (ISO) ; metilcarbamato de 2-etiltiometilfenilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

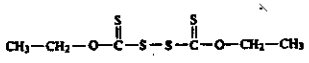
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 502-55-6 | EEC No 207-944-4 | No 006-049-00-4



dixantógeno ; ditiobis(tioformiato) de O,O-dietilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

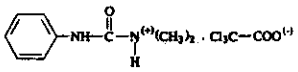
Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 4482-55-7 | EEC No — | No 006-050-00-X



tricloroacetato de 1,1-dimetilfeniluronio ; fenuron-tricloroacetato

Clasificación,

Xi ; R 38

Etiquetado,

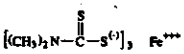
Xi

R : 38

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 14484-64-1 | EEC No 238-484-2 | No 006-051-00-5



terbam (ISO) ; tris(dimetilditiocarbamato) de hierro

Clasificación,

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

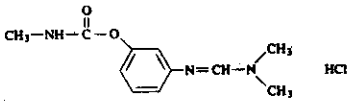
Xi

R : 36/37/38

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 23422-53-9 | EEC No 245-656-0 | No 006-052-00-0



formetanato - clorhidrato

Clasificación,

T+ ; R 28

Etiquetado,

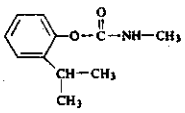
T+

R : 28

S : (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2631-40-5 | EEC No 220-114-6 | No 006-053-00-6



isoprocarb (ISO); metilcarbamato de o-cumenilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

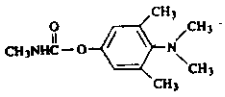
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 315-18-4 | EEC No 206-249-3 | No 006-054-00-1



mexacarbato (ISO); metilcarbamato de 4-dimetilamino-3,5-xililo

Clasificación,

T+; R 28 | Xn; R 21

Etiquetado,

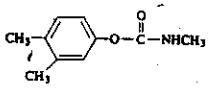
T+

R: 21-28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2425-10-7 | EEC No 219-364-9 | No 006-055-00-7



xylylcarb (ISO); metilcarbamato de 3,4-xililo; MPMC

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

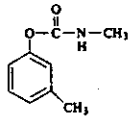
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 1129-41-5 | EEC No 214-446-0 | No 006-056-00-2



metolcarb (ISO); metilcarbamato de m-tolilo; MTMC

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

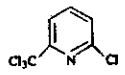
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 1929-82-4 | EEC No 217-682-2 | No 006-057-00-8



nitrapyrin (ISO) ; 2-cloro-6-tricloromethilpiridina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

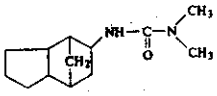
Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 2163-79-3 | EEC No — | No 006-058-00-3



noruron (ISO) ; 1,1-dimetil-3-(perhidro-4,7-metanoinden-5-il)urea

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

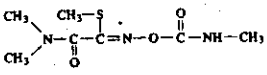
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 23135-22-0 | EEC No 245-445-3 | No 006-059-00-9



N-metilcarbamato de N',N'-dimetilcarbamoil(metiltio)metilenamina ; oxamil

Clasificación,

T+ ; R 26/28 | Xn ; R 21

Etiquetado,

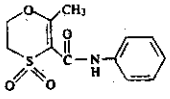
T+

R : 21-26/28

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 5259-88-1 | EEC No 226-066-2 | No 006-060-00-4



oxicarboxin (ISO) ; 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatiin-3-carboxanilida 4,4-dioxido

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

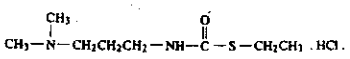
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 19622-19-6 | EEC No 243-193-9 | No 006-061-00-X



N-(dimetilaminopropil)tiocarbamato de S-etilo clorhidrato; protiocarb clorhidrato

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

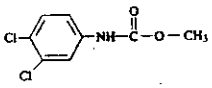
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 1918-18-9 | EEC No — | No 006-062-00-5



3,4-diclorofenilcarbamato de metilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

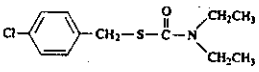
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 28249-77-6 | EEC No 248-924-5 | No 006-063-00-0



dietiltiocarbamato de S-4-clorobencilo; tiobencarb

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

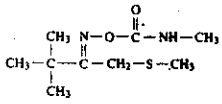
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 39196-18-4 | EEC No 254-346-4 | No 006-064-00-6



3,3-dimetil-1-(metiltio)butanona-O-(N-metilcarbamoil)oxima; tiofanox

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

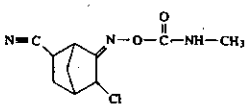
T+

R: 27/28

S: (1/2-)27-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 15271-41-7 | EEC No — | No 006-065-00-1



3-cloro-6-ciano-biciclo(2,2,1)heptan-2-ona-O(N-metilcarbamoil)oxima

Clasificación,

T+ ; R 28 | T ; R 24

Etiquetado,

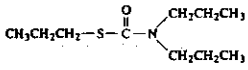
T+

R : 24-28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 1929-77-7 | EEC No 217-681-7 | No 006-066-00-7



dipropiltiocarbamato de S-propilo ; vernolato

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

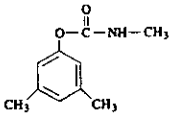
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 2655-14-3 | EEC No — | No 006-067-00-2



metilcarbamato de 3,5-xililo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 334-88-3 | EEC No 206-382-7 | No 006-068-00-8

CH_2N_2

diazometano

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado,

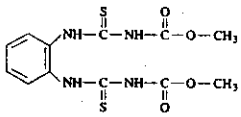
T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 23564-05-8 | EEC No 245-740-7 | No 006-069-00-3



tiofanato-metil

Clasificación,

Muta. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

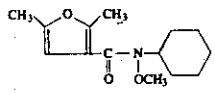
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 60568-05-0 | EEC No 262-302-0 | No 006-070-00-9



N-ciclohexil-2,5-dimetil-N-metoxi-3-furamida

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

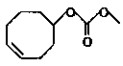
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 87731-18-8 | EEC No 401-620-8 | No 006-071-00-4



carbonato de ciclooct-4-en-1-ilo y de metilo

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

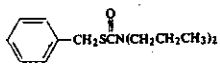
Xi

R : 43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 52888-80-9 | EEC No 401-730-6 | No 006-072-00-X



N,N-dipropiltiocarbamato de S-bencilo

Clasificación,

Xn ; R 22-48/22 | N ; R 51-53

Etiquetado,

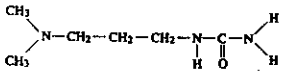
Xn N

R : 22-48/22-51/53

S : (2-)37-61

Límites de concentración,

Cas No 31506-43-1 | EEC No 401-950-2 | No 006-073-00-5



3-(dimetilamino)propilurea

Clasificación,

Xi ; R 41

Etiquetado,

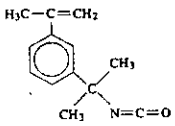
Xi

R : 41

S : (2-)26-39

Límites de concentración,

Cas No 2094-99-7 | EEC No 402-440-2 | No 006-074-00-0



isocianato de 2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)prop-2-ilo

Clasificación,

T+ ; R 26	C ; R 34	Xn ; R 48/20	R 42/43	N ; R 50-53

Etiquetado,

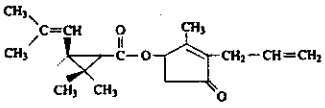
T+ N

R : 26-34-42/43-48/20-50/53

S : (1/2-)7-15-28-36/37/39-38-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 584-79-2 | EEC No 209-542-4 | No 006-075-00-6



bioaletrina ; (+)-trans-crisantemato de (+-)-3-alil-2-metil-4-oxociclopent-2-enilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 7664-41-7 | EEC No 231-635-3 | No 007-001-00-5

NH_3

amoníaco anhidro

Clasificación,

R 10	T ; R 23

Etiquetado,

T

R : 10-23

S : (1/2-)7/9-16-38-45

Límites de concentración,

Cas No 1336-21-6 | EEC No 215-647-6 | No 007-001-01-2

NOTA B

NH_3 conc ... %

amoniaco en solución acuosa ... %

Clasificación,

C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 34-37

S: (1/2-)7-26-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	C; R 34-37
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 10102-44-0 [1]
10544-72-6 [2]

EEC No 233-272-6 [1]
234-126-4 [2]

No 007-002-00-0

NO_2 [1] N_2O_4 [2]

dióxido de nitrógeno [1]; tetróxido de dinitrógeno [2]

Clasificación,

T+; R 26	Xi; R 37

Etiquetado, Etikettering,

T+

R: 26-37

S: (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

Cas No 999-81-5 | EEC No 213-666-4 | No 007-003-00-6

$[CH_2Cl — CH_2 — {}^+N(CH_3)_3]. Cl^-$

cloruro de clormecuat (ISO); cloruro de 2-cloroetiltrimetilamonio

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 7697-37-2 | EEC No 231-714-2 | No 007-004-00-1

NOTA B

HNO_3 ...%

ácido nítrico ... %

Clasificación,

O; R 8	C; R 35

Etiquetado,

O C

R: 8-35

S: (1/2-)23-26-36-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	C; R 35
5 % ≤ C < 20 %	C; R 34

O

C ≥ 70% : ; R 8

Cas No 51602-38-1 | EEC No — | No 007-005-00-7

NOTA B

HNO_3
+ [conc HNO_3 > 30%]
H_2SO_4

mezcla sulfonítrica conteniendo ... % HNO_3

Clasificación,

O; R 8	C; R 35

Etiquetado,

O C

R: 8-35

S: (1/2-)23-26-30-36-45

Límites de concentración,

Cas No 109-95-5 | EEC No 203-722-6 | No 007-006-00-2

$C_2H_5 — O — NO$

nitrito de etilo

Clasificación,

E; R 2	Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

E Xn

R: 2-20/21/22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 625-58-1 | EEC No 210-903-3 | No 007-007-00-8

$C_2H_5 — O — NO_2$

nitrato de etilo

Clasificación,

E; R 2

Etiquetado,

E

R: 2

S: (2-)23-24/25

Límites de concentración,

Cas No 302-01-2 | EEC No 206-114-9 | No 007-008-00-3

NOTA E

$NH_2 — NH_2$

hidrazina

Clasificación,

R 10	Carc. Cat. 2; R 45	T; R 23/24/25	C; R 34	R 43

Etiquetado,

T

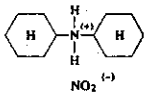
R: 45-10-23/24/25-34-43

S: 53-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	T; R 45-23/24/25-34-43
10 % ≤ C < 25 %	T; R 45-20/21/22-34-43
3 % ≤ C < 10 %	T; R 45-20/21/22-36/38-43
1 % ≤ C < 3 %	T; R 45-43
0,1 % ≤ C < 1 %	T; R 45

Cas No 3129-91-7	EEC No 221-515-9	No 007-009-00-9



nitrito de diciclohexilamonio

Clasificación,

Xn ; R 20/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/22

S : (2-)13-41

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xn ; R 20/22

Cas No 7632-00-0	EEC No 231-555-9	No 007-010-00-4

$NaNO_2$

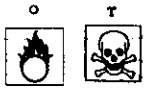
nitrito de sodio

Clasificación,

O ; R 8	T ; R 25

Etiquetado,

O T



R : 8-25

S : (1/2-)45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	T ; R 25
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 22

Cas No 7758-09-0	EEC No 231-832-4	No 007-011-00-X

KNO_2

nitrito de potasio

Clasificación,

O ; R 8	T ; R 25

Etiquetado,

O T

R : 8-25

S : (1/2-)45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	T ; R 25
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 22

Cas No 57-14-7	EEC No 200-316-0	No 007-012-00-5

NOTA E

N,N-dimetilhidrazina

Clasificación,

F ; R 11	Carc. Cat. 2 ; R 45	T ; R 23/25	C ; R 34

Etiquetado,

F T

R : 45-11-23/25-34

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 540-73-8 | EEC No — | No 007-013-00-0

NOTA E

$CH_3 — NH — NH — CH_3$

1,2-dimetilhidrazina

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T; R 23/24/25

Etiquetado,

T

R: 45-23/24/25

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 007-014-00-6

NOTA A

NOTA E

sales de hidrazina

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T; R 23/24/25	R 43

Etiquetado,

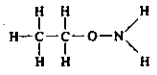
T

R: 45-23/24/25-43

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 624-86-2 | EEC No 402-030-3 | No 007-015-00-1



O-etilhidroxilamina

Clasificación,

F; R 11	T; R 23/24/25	Xn; R 48/20	Xi; R 36	R 43	N; R 50

Etiquetado,

F T N

R: 11-23/24/25-36-43-48/20-50

S: (1/2-)16-26-36/37/39-38-45-61

Límites de concentración,

Cas No 544-16-1 | EEC No 208-862-1 | No 007-016-00-7

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — ONO$

nitrito de butilo

Clasificación,

F; R 11	T; R 23/25

Etiquetado,

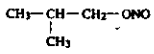
F T

R: 11-23/25

S: (1/2-)16-24-45

Límites de concentración,

Cas No 542-56-3 | EEC No 208-819-7 | No 007-017-00-2



nitrito de isobutilo

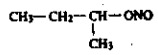
Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20/22

Etiquetado,

Límites de concentración,

Cas No 924-43-6 | EEC No 213-104-8 | No 007-018-00-8



nitrito de *sec*-butilo

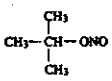
Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20/22

Etiquetado,

Límites de concentración,

Cas No 540-80-7 | EEC No 208-757-0 | No 007-019-00-3



nitrito de *terc*-butilo

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20/22

Etiquetado,

Límites de concentración,

Cas No 463-04-7[1]
110-46-3[2]

EEC No 207-332-7 [1]
203-770-8 [2]

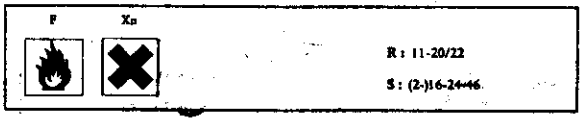
No 007-020-00-0

nitrito de pentilo [1] «nitrito de amilo», mezcla de isómeros [2]

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20/22

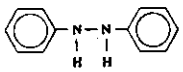
Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 122-66-7 | EEC No 204-563-5 | No 007-021-00-4

NOTA E



hidrazobenceno

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7782-44-7 | EEC No 231-956-9 | No 008-001-00-8

O_2

oxígeno líquido

Clasificación,

O ; R 8	C ; R 34

Etiquetado,

O C

R : 8-34

S : (1/2-)21-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 008-002-00-3

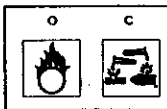
aire líquido

Clasificación,

O ; R 8	C ; R 34

Etiquetado,

O C



R : 8-34

S : (1/2-)21-45

Límites de concentración,

Cas No 7722-84-1 | EEC No 231-765-0 | No 008-003-00-9

NOTA B

H_2O_2 ... %

peróxido de hidrógeno en solución ... % ; agua oxigenada ... %

Clasificación,

O ; R 8	C ; R 34

Etiquetado,

O C

R : 8-34

S : (1/2-)3-28-36/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	C ; R 34
5 % ≤ C < 20 %	Xi ; R 36/38

C ≥ 60% : O ; R 8

Cas No 7782-41-4	EEC No 231-954-8	No 009-001-00-0

F_2

flúor

Clasificación,

R7	T+ ; R 26	C; R 35

Etiquetado,

T+ C

R : 7-26-35

S : (1/2-)7/9-36-45

Límites de concentración,

Cas No 7664-39-3	EEC No 231-634-8	No 009-002-00-6

HF

fluoruro de hidrógeno ; ácido fluorhídrico

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	C; R 35

Etiquetado,

T+ C

R : 26/27/28-35

S : (1/2-)7/9-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 7664-39-3	EEC No 231-634-8	No 009-003-00-1

NOTA B

HF ... %

fluoruro de hidrógeno ... % ; ácido fluorhídrico ... %

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	C; R 35

Etiquetado,

T+ C

R : 26/27/28-35

S : (1/2-)7/9-26-36/37-45

Límites de concentración,

C ≥ 7%	T+ ; C; R 26/27/28-35
1% ≤ C < 7%	T; C; R 23/24/25-34
0,1% ≤ C < 1%	Xn ; R 20/21/22-36

Cas No 7681-49-4	EEC No 231-667-8	No 009-004-00-7

NaF

fluoruro de sodio

Clasificación,

T; R 25	Xi ; R 36/38	R 32

Etiquetado,

T

R : 25-32-36/38

S : (1/2-)22-36-45

Límites de concentración,

Cas No 7789-23-3 | EEC No 232-151-5 | No 009-005-00-2

KF

fluoruro de potasio

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 12125-01-8 | EEC No 235-185-9 | No 009-006-00-8

NH_4F

fluoruro de amonio

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 1333-83-1 | EEC No 215-608-3 | No 009-007-00-3

NaF.HF

difluoruro de sodio

Clasificación,

T; R 25	C; R 34

Etiquetado,

T C

R: 25-34

S: (1/2-)22-26-37-45

Límites de concentración,

C ≥ 10%	T; C; R 25-34
1% ≤ C < 10%	C; R 22-34
0,1% ≤ C < 1%	Xi; R 36/38

Cas No 7789-29-9 | EEC No 232-156-2 | No 009-008-00-9

KF.HF

difluoruro de potasio

Clasificación,

T; R 25	C; R 34

Etiquetado,

T C

R: 25-34

S: (1/2-)22-26-37-45

Límites de concentración,

C ≥ 10%	T; C; R 25-34
1% ≤ C < 10%	C; R 22-34
0,1% ≤ C < 1%	Xi; R 36/38

Cas No 1341-49-7 | EEC No 215-676-4 | No 009-009-00-4

$NH_4F.HF$

difluoruro de amonio

Clasificación,

T; R 25 | C; R 34

Etiquetado,

T C

R: 25-34

S: (1/2-)22-26-37-45

Límites de concentración,

C ≥ 10%	T; C; R 25-34
1% ≤ C < 10%	C; R 22-34
0,1% ≤ C < 1%	Xi; R 36/38

Cas No 16872-11-0 | EEC No 240-898-3 | No 009-010-00-X

NOTA B

HBF_4 _ %

ácido fluorobórico; tetrafluoroborato de hidrógeno _%

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-27-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 36/38

Cas No 16961-83-4 | EEC No 241-034-8 | No 009-011-00-5

NOTA B

H_2SiF_6 _ %

ácido fluorosilícico; hexafluorosilicato de hidrógeno _ %

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-27-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	C; R 34
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 16893-85-9 [1]
16871-90-2 [2]
16919-19-0 [3]

EEC No 240-934-8 [1]
240-896-2 [2]
240-968-3 [3]

No 009-012-00-0

NOTA A

Na_2SiF_6 [1]
K_2SiF_6 [2]
$[NH_4]_2SiF_6$ [3]

hexafluorosilicatos alcalinos; fluorosilicatos alcalinos (Na [1], K [2], NH_4 [3])

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	T; R 23/24/25
1 % ≤ C < 10 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 009-013-00-6

NOTA A

$[M]_2 [SiF_6]_n$

hexafluorosilicatos; fluorosilicatos, excepto los especialmente indicados en este Anexo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

R: 22

S: (2-)13-24/25

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xn; R 22

Cas No 25808-74-6	EEC No 247-278-1	No 009-014-00-1

NOTA E

$PbSiF_6$

hexafluorisilicato de plomo

Clasificación,

Repr. Cat. 1; R 61	Xn; R 20/22	R 33

Etiquetado,

T

R: 61-20/22-33

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 2699-79-8	EEC No 220-281-5	No 009-015-00-7

difluoruro de sulfurilo

Clasificación,

T; R 23/25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

T

R: 23/25-36/37/38

S: (1/2-)23-37/38-45

Límites de concentración,

Cas No 15096-52-3	EEC No 239-148-8	No 009-016-00-2

$Na_3 AlF_6$

hexafluoroaluminato de trisodio

Clasificación,

Xn; R 20/22	T; R 48/23/25

Etiquetado,

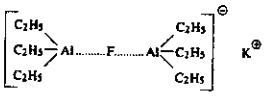
T

R: 20/22-48/23/25

S: (1/2-)22-37-45

Límites de concentración,

Cas No 12091-08-6	EEC No 400-040-2	No 609-017-00-8



mu-fluoro-bis(trietilaluminio) de potasio

Clasificación,

F; R 11-14/15	C; R 35	Xn; R 20

Etiquetado,

F C

R: 11-14/15-20-35

S: (1/2-)16-30-36/39-43-45

Límites de concentración,

Cas No 7440-23-5	EEC No 231-132-9	No 011-001-00-0

Na

sodio

Clasificación,

F; R 14/15	C; R 34

Etiquetado,

F C

R: 14/15-34

S: (1/2-)5*-8-43-45

* S 5 no debe ser utilizado si se emplea otro embalaje de seguridad.

Límites de concentración,

Cas No 1310-73-2	EEC No 215-185-5	No 011-002-00-6

NaOH

hidróxido de sodio

Clasificación,

C; R 35

Etiquetado,

C

R: 35

S: (1/2-)26-37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	C; R 35
2 % ≤ C < 5 %	C; R 34
0,5 % ≤ C < 2 %	Xi; R 36/38

Cas No 1313-60-6	EEC No 215-209-4	No 011-003-00-1

Na_2O_2

peróxido de sodio

Clasificación,

O; R 8	C; R 35

Etiquetado,

O C

R: 8-35

S: (1/2-)8-27-39-45

Límites de concentración,

Cas No 26628-22-8 | EEC No 247-852-1 | No 011-004-00-7

trinitruro de sodio; azida sódica

Clasificación,

T+; R 28 | R 32

Etiquetado,

T+

R: 28-32

S: (1/2-)28-45

Límites de concentración,

Cas No 497-19-8 | EEC No 207-838-8 | No 011-005-00-2

Na_2CO_3

carbonato de sodio

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R: 36

S: (2-)22-26

Límites de concentración,

Cas No 917-61-3 | EEC No 213-030-6 | No 011-006-00-8

NaOCN

cianato de sodio

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

R: 22

S: (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No 7439-95-4 | EEC No 231-104-6 | No 012-001-00-3

Mg

magnesio en polvo (pirofórico)

Clasificación,

F; R 15-17

Etiquetado,

F

R: 15-17

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 231-104-6	No 012-002-00-9

Mg

magnesio en polvo (estabilizado) o en virutas

Clasificación,

F; R 11-15

Etiquetado,

F

R: 11-15

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 012-003-00-4

NOTA A

$Mg\ (C_nH_{2n+1})_2$
$n = 1 - 5$

derivados de alquilmagnesio

Clasificación,

R 14	F; R 17	C; R 34

Etiquetado,

F C

R: 14-17-34

S: (1/2-)16-43-45

Límites de concentración,

Cas No 7429-90-5	EEC No 231-072-3	No 013-001-00-6

Al

aluminio en polvo (pirofórico)

Clasificación,

F; R 15-17

Etiquetado,

F

R: 15-17

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 231-072-3	No 013-002-00-1

Al

aluminio en polvo (estabilizado)

Clasificación,

F; R 15	R 10

Etiquetado,

R: 10-15

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No 7446-70-0	EEC No 231-208-1	No 013-003-00-7

$AlCl_3$

cloruro de aluminio anhidro

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)7/8-28-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 013-004-00-2

NOTA A

$Al(C_nH_{2n+1})_3$
$n = 1 - 5$

derivados de alquilaluminio

Clasificación,

R 14	F; R 17	C; R 34

Etiquetado,

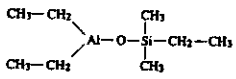
F C

R: 14-17-34

S: (1/2-)16-43-45

Límites de concentración,

Cas No 55426-95-4	EEC No 401-160-8	No 013-005-00-8



dietil(etildimetilsilanolato)aluminio

Clasificación,

F; R 14/15-17	C; R 35

Etiquetado,

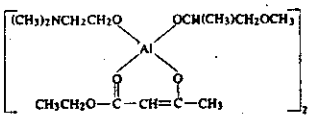
F C

R: 14/15-17-35

S: (1/2-)6-16-30-36/39-43-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 402-370-2	No 013-006-00-3



(etil-3-oxobutanoato-O'1,O'3)(2-dimetilaminoetanolato)(1-metoxi-2-propanolato)aluminio(III), dimerizado

Clasificación,

R 10	Xi; R 41

Etiquetado,

Xi

R: 10-41

S: (2-)26-39

Límites de concentración,

Cas No 10025-78-2	EEC No 233-042-5	No 014-001-00-9

$SiHCl_3$

triclorosilano

Clasificación,

F; R 15-17

Etiquetado,

F

R : 15-17

S : (2-)24/25-43

Límites de concentración,

Cas No 10026-04-7	EEC No 233-054-0	No 014-002-00-4

$SiCl_4$

tetracloruro de silicio

Clasificación,

R 14	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R : 14-36/37/38

S : (2-)7/8-26

Límites de concentración,

Cas No 75-78-5	EEC No 200-901-0	No 014-003-00-X

dimetildiclorosilano

Clasificación,

F; R 11	Xi; R 36/37/38

Etiquetado

F Xi

R : 11-36/37/38

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 75-79-6	EEC No 200-902-6	No 014-004-00-5

CH_3SiCl_3

metiltriclorosilano

Clasificación,

R 14	F; R 11	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

F Xi

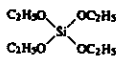
R : 11-14-36/37/38

S : (2-)26-39

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 78-10-4 | EEC No 201-083-8 | No 014-005-00-0



silicato de tetraetilo

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

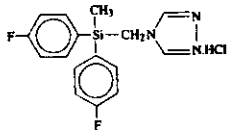
Xn

R : 10-20-36/37

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 401-380-4 | No 014-006-00-6



bis(4-fluorofenil)-metil-(1,2,4-triazol-4-ilmetil)silano, clorhidrato

Clasificación,

Xi ; R 36	N ; R 51-53

Etiquetado,

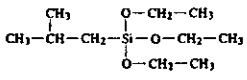
Xi N

R : 36-51/53

S : (2-)26-61

Límites de concentración,

Cas No 17980-47-1 | EEC No 402-810-3 | No 014-007-00-1



trietoxiisobutilsilano

Clasificación,

Xi ; R 38

Etiquetado,

Xi

R : 38

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 85491-26-5 | EEC No 401-200-4 | No 014-008-00-7

$C_{14}H_{13}ClF_2Si$

(clorometil)bis(4-fluorofenil)metilsilano

Clasificación,

N ; R 51-53

Etiquetado,

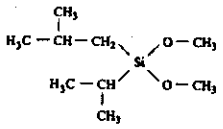
N

R : 51/53

S : 61

Límites de concentración,

Cas No 111439-76-0	EEC No 402-580-4	No 014-009-00-2



isobutilisopropildimetoxisilano

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20	Xi ; R 38

Etiquetado,

Xn

R : 10-20-38

S : (2-)25-26-36/37

Límites de concentración,

Cas No 6834-92-0	EEC No 229-912-9	No 014-010-00-8

$H_2O_3Si.2Na$

metasilicato de disodio

Clasificación,

C ; R 34	Xi ; R 37

Etiquetado,

C

R : 34-37

S : (1/2-)13-24/25-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 12185-10-3	EEC No —	No 015-001-00-1

P_4

fósforo blanco

Clasificación,

F ; R 17	T+ ; R 26/28	C ; R 35

Etiquetado,

F T+ C

R : 17-26/28-35

S : (1/2-)5-26-28-45

Límites de concentración,

Cas No 7723-14-0	EEC No 231-768-7	No 015-002-00-7

$P_{(n)}$

fósforo rojo

Clasificación,

R 16	F ; R 11

Etiquetado,

F

R : 11-16

S : (2-)7-43

Límites de concentración,

Cas No 1305-99-3	EEC No 215-142-0	No 015-003-00-2

Ca_3P_2

fosfuro de calcio

Clasificación,

F; R 15/29	T+; R 28

Etiquetado,

F T+

R: 15/29-28

S: (1/2-)22-43-45

Límites de concentración,

Cas No 20859-73-8	EEC No 244-088-0	No 015-004-00-8

Al P

fosfuro de aluminio

Clasificación,

F; R 15/29	T+; R 28	R 32

Etiquetado,

F T+

R: 15/29-28-32

S: (1/2-)3/9/14-30-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 12057-74-8	EEC No 235-023-7	No 015-005-00-3

Mg_3P_2

fosfuro de magnesio

Clasificación,

F; R 15/29	T+; R 28

Etiquetado,

F T+

R: 15/29-28

S: (1/2-)22-43-45

Límites de concentración,

Cas No 1314-84-7	EEC No 215-244-5	No 015-006-00-9

Zn_3P_2

difosfuro de tricinc

Clasificación,

F; R 15/29	T+; R 28	R 32

Etiquetado,

T+ F

R: 15/29-28-32

S: (1/2-)3/9/14-30-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 7719-12-2 | EEC No 231-749-3 | No 015-007-00-4

PCl_3

tricloruro de fósforo

Clasificación,

C; R 34 | Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 34-37

S: (1/2-)7/8-26-45

Límites de concentración,

Cas No 10026-13-8 | EEC No 233-060-3 | No 015-008-00-X

PCl_5

pentacloruro de fósforo

Clasificación,

C; R 34 | Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 34-37

S: (1/2-)7/8-26-45

Límites de concentración,

Cas No 10025-87-3 | EEC No 233-046-7 | No 015-009-00-5

$POCl_3$

oxicloruro de fósforo; tricloruro de fosforilo

Clasificación,

C; R 34 | Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 34-37

S: (1/2-)7/8-26-45

Límites de concentración,

Cas No 1314-56-3 | EEC No 215-236-1 | No 015-010-00-0

P_2O_5

pentóxido de fósforo

Clasificación,

C; R 35

Etiquetado,

C

R: 35

S: (1/2-)22-26-45

Límites de concentración,

Cas No 7664-38-2 | EEC No 231-633-2 | No 015-011-00-6

NOTA B

H_3PO_4 _ %

ácido fosfórico _ %; ácido ortofosfórico _ %

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 36/38

Cas No 1314-85-8 | EEC No 215-245-0 | No 015-012-00-1

P_4S_3

trisulfuro de tetrafósforo; sesquisulfuro de fósforo

Clasificación,

F; R 11 | Xn; R 22

Etiquetado,

F Xn

R: 11-22

S: (2-)7-16-24/25

Límites de concentración,

Cas No 78-40-0 | EEC No 201-114-5 | No 015-013-00-7

fosfato de trietilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

R: 22

S: (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 126-73-8 | EEC No 204-800-2 | No 015-014-00-2

fosfato de tributilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

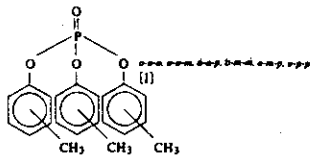
R: 22

S: (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 78-30-8 [I] | EEC No 201-103-5 [I] | No 015-015-00-8

NOTA C



fosfatos de tritolilo; fosfatos de tricresilo; *o-o-o, o-o-m, o-o-p, o-m-m, o-m-p, o-p-p*

Clasificación,

T; R 39/23/24/25

Etiquetado,

T

R: 39/23/24/25

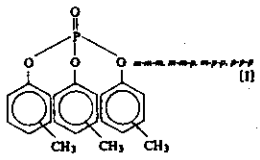
S: (1/2-)20/21-28-45

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	T; R 39/23/24/25
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn; R 40/20/21/22

Cas No 78-32-0 [I] | EEC No 201-105-6 [I] | No 015-016-00-3

NOTA C



fosfatos de tritolilo; fosfatos de tricresilo; *m-m-m, m-m-p, m-p-p, p-p-p*

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

Xn

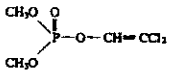
R: 21/22

S: (2-)28

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xn; R 21/22

Cas No 62-73-7 | EEC No 200-547-7 | No 015-019-00-X



diclorvos (ISO); fosfato de 2,2-diclorovinilo y dimetilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

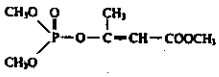
T

R: 24/25

S: (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 7786-34-7 | EEC No 232-095-1 | No 015-020-00-5



mevinfos (ISO); fosfato de 2-metoxicarbonil-1-metilvinilo y de dimetilo

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

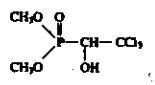
T+

R: 27/28

S: (1/2-)23-28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 52-68-6	EEC No 200-149-3	No 015-021-00-0



triclorfon (ISO); 2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfonato de dimetilo

Clasificación,

Xn; R 22	R 43

Etiquetado,

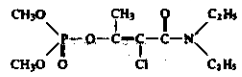
Xn

R: 22-43

S: (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 13171-21-6	EEC No 236-116-5	No 015-022-00-6



fosfato de dimetilo y de 2-cloro-2-(N,N-dietilcarbamoil)-1-metilvinilo; fosfamidon

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24	Muta. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

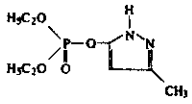
T

R: 24-28-40

S: (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 108-34-9	EEC No —	No 015-023-00-1



fosfato de dietilo y de 3-metil-5-pirazolilo; pirazoxón

Clasificación,

T+; R 26/27/28

Etiquetado,

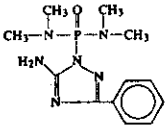
T+

R: 26/27/28

S: (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No 1031-47-6	EEC No —	No 015-024-00-7



triamifos (ISO); 5-amino-3-fenil-1,2,4-triazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametilfosfonodiamida

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

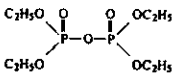
T

R: 27/28

S: (1/2-)22-28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 107-49-3 | EEC No 203-495-3 | No 015-025-00-2



TEPP (ISO); pirofosfato de tetraetilo

Clasificación.

T+; R 27/28

Etiquetado.

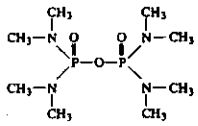
T+

R: 27/28

S: (1/2-)36/37/39-38-45

Límites de concentración.

Cas No 152-16-9 | EEC No 205-801-0 | No 015-026-00-8



escredano (ISO); octametilpirofosforamida

Clasificación.

T+; R 27/28

Etiquetado.

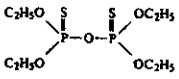
T

R: 27/28

S: (1/2-)36/37-38-45

Límites de concentración.

Cas No 3689-24-5 | EEC No 222-995-2 | No 015-027-00-3



sulfotep (ISO); ditiopirofosfato de O,O,O,O-tetraetilo

Clasificación.

T+; R 27/28

Etiquetado.

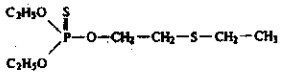
T+

R: 27/28

S: (1/2-)23-28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 298-03-3 | EEC No 206-053-8 | No 015-028-00-9



demeton-O (ISO); tiofosfato de O-2-etiltioetilo y de O,O-dietilo

Clasificación.

T+; R 27/28

Etiquetado.

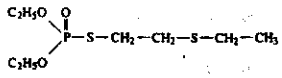
T

R: 27/28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 126-75-0 | EEC No 204-801-8 | No 015-029-00-4

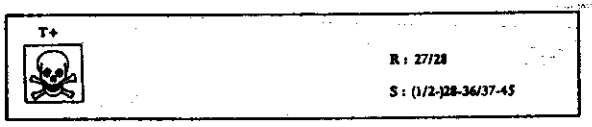


demeton-S (ISO); tiofosfato de dietilo y de S-2-etiltioetilo

Clasificación,

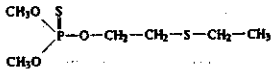
T+ ; R 27/28

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 867-27-6 | EEC No 212-758-1 | No 015-030-00-X

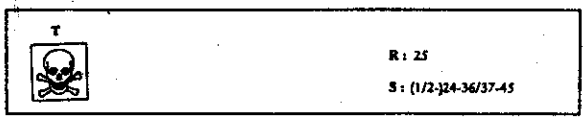


demeton-O-metil (ISO); tiofosfato de O-2-etiltioetilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

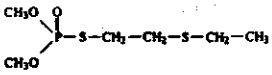
T; R 25

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 919-86-8 | EEC No 213-052-6 | No 015-031-00-5



demeton-S-metil (ISO); tiofosfato de S-2-etiltioetilo y de dimetilo

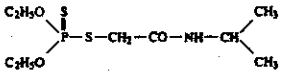
Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

Límites de concentración,

Cas No 2275-18-5 | EEC No 218-893-2 | No 015-032-00-6



prosulfocarb (ISO); ditiofosfato de O,O-dietilo y isopropilcarbamoilmetilo

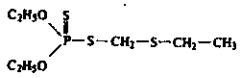
Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

Límites de concentración,

Cas No 298-02-2 | EEC No 206-052-2 | No 015-033-00-6



forato (ISO); ditiofosfato de O,O-dietilo y etiltiometilo

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

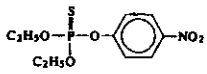
T+

R : 27/28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 56-38-2 | EEC No 200-271-7 | No 015-034-00-1



parathion (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y O-4-nitrofenilo

Clasificación,

T+ ; R 27/28 | N ; R 50-53

Etiquetado,

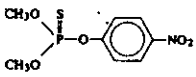
T+ N

R : 27/28-50/53

S : (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 298-00-0 | EEC No 206-050-1 | No 015-035-00-7



parathion - metil (ISO); tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-4-nitrofenilo

Clasificación,

T+ ; R 28 | T ; R 24

Etiquetado,

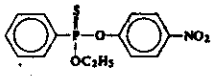
T+

R : 24-28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2104-64-5 | EEC No 218-276-8 | No 015-036-00-2



fenitiofosfato de O-etilo y de O-4-nitrofenilo; EPN

Clasificación,

T+ ; R 27/28 | N ; R 50-53

Etiquetado,

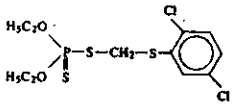
T+ N

R : 27/28-50/53

S : (1/2-)22-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 2275-14-1 | EEC No 218-892-7 | No 015-037-00-8



lencapton ; ditiofosfato de O,O-dietilo y de S-(2,5-diclorofenilsiometilo)

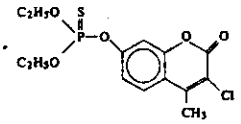
Clasificación.

T ; R 23/24/25

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 56-72-4 | EEC No 200-285-3 | No 015-038-00-3

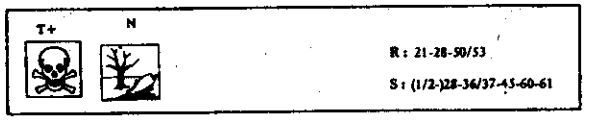


cumafos (ISO) ; tiofosfato de O-3-cloro-4-metilcumarin-7-ilo y de O,O-dietilo

Clasificación.

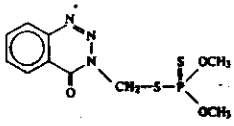
T+ ; R 28 | Xn ; R 21 | N ; R 50-53

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 86-50-0 | EEC No 201-676-1 | No 015-039-00-9

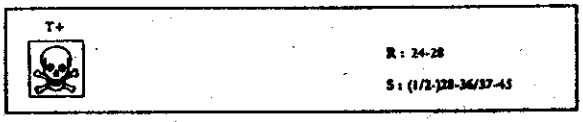


azinfos-dietil (ISO) ; ditiofosfato de O,O-dimetilo y de 4-oxobenzotriazin-3-ilmetilo

Clasificación.

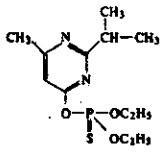
T+ ; R 28 | T ; R 24

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 333-41-5 | EEC No 206-373-8 | No 015-040-00-4

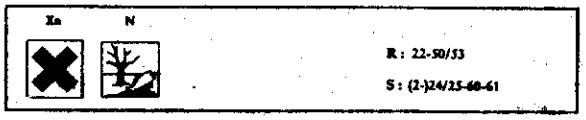


diazinon (ISO) ; dimpilato (DCI) ; tiofosfato de O,O-dietilo y de O-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-ilo

Clasificación.

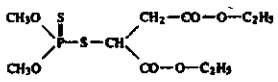
Xn ; R 22 | N ; R 50-53

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 121-75-5 | EEC No 204-497-7 | No 015-041-00-X



malation (ISO) ; ditiofosfato de 1,2-bis(etoxicarbonil)etilo y de O,O-dimetilo ; (dimetoxifosfinotioiltio)succinato de dietilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

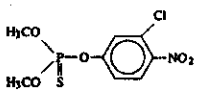
Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 500-28-7 | EEC No 207-902-5 | No 015-042-00-5



tiofosfato de *O,O*-dimetilo y de *O*-(3-cloro-4-nitrofenilo) ; clortion (nombre común no adoptado por ISO)

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

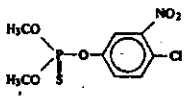
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 5826-76-6 | EEC No — | No 015-043-00-0



tiofosfato de *O,O*-dimetilo y de *O*-(4-cloro-3-nitrofenilo) ; fenniclor

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

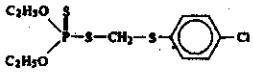
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 786-19-6 | EEC No 212-324-1 | No 015-044-00-6



carbofenotion (ISO) (DCI) ; ditiofosfato de 4-clorofenilticometilo y de O,O-dietilo

Clasificación,

T ; R 24/25 | N ; R 50-53

Etiquetado,

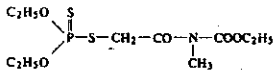
T N

R : 24/25-50/53

S : (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 2595-54-2 | EEC No 219-993-9 | No 015-045-00-1



mecarbam (ISO); ditiofosfato de O,O-dietilo y N-etoxicarbonil-N-metilcarbamoilmetilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

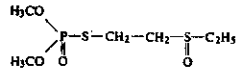
T

R: 24/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 301-12-2 | EEC No 206-110-7 | No 015-046-00-7



tiofosfato de-O,O-dimetilo y de S-(2-etilsulfinil-etilo); oxidemeton-metil

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

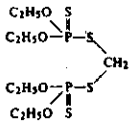
T

R: 24/25

S: (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 563-12-2 | EEC No 209-242-3 | No 015-047-00-2



etion (ISO); S,S'-metilendi (ditiofosfato) de O,O,O',O'-tetraetilo

Clasificación,

T; R 25	Xn; R 21

Etiquetado,

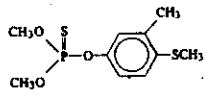
T

R: 21-25

S: (1/2-)25-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 55-38-9 | EEC No 200-231-9 | No 015-048-00-8



fention (ISO); tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-(4-metiltio-m-tolilo)

Clasificación,

T; R 25	Xn; R 21	N; R 50-53

Etiquetado,

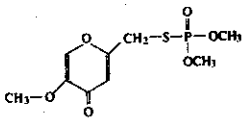
T N

R: 21-25-50/53

S: (1/2-)36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 2778-04-3 | EEC No 220-472-3 | No 015-049-00-3



endotion (ISO); tiofosfato de dimetilo y de S-5-metoxi-4-oxopiran-2-ilmetilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

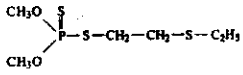
T

R: 24/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 640-15-3 | EEC No 211-362-6 | No 015-050-00-9



tiometon (ISO); ditiofosfato de S-2-etiltioetilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

T; R 25 | Xn; R 21

Etiquetado,

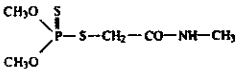
T

R: 21-25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 60-51-5 | EEC No 200-480-3 | No 015-051-00-4



dimetoato (ISO); ditiofosfato de metilcarbamoilmetilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

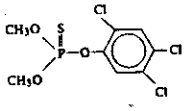
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 299-84-3 | EEC No 206-082-6 | No 015-052-00-X



fenclorfos (ISO); fenclofos (DCI); tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-2,4,5-triclorofenilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

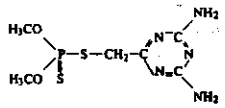
Xn

R: 21/22

S: (2-)25-36/37

Límites de concentración,

Cas No 78-57-9 | EEC No 201-123-4 | No 015-053-00-5



menazon ; ditiofosfato de O,O-dimetilo y de S-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-il)metilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

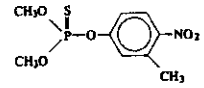
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 122-14-5 | EEC No 204-524-2 | No 015-054-00-0



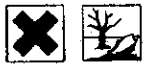
fenitrotion (ISO) ; tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-4-nitro-m-tolilo

Clasificación,

Xn ; R 22 | N ; R 50-53

Etiquetado,

Xn N

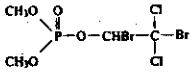


R : 22-50/53

S : (2-)60-61

Límites de concentración,

Cas No 300-76-5 | EEC No 206-098-3 | No 015-055-00-6



naled (ISO) ; fosfato de 1,2-dibromo-2,2-dicloroetilo y de dimetilo

Clasificación,

Xn ; R 21/22 | Xi ; R 36/38

Etiquetado,

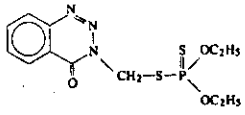
Xn

R : 21/22-36/38

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 2642-71-9 | EEC No 220-147-6 | No 015-056-00-1



azinfos-etil (ISO) ; ditiofosfato de O,O-dietilo y de 4-oxobenzotriazin-3-ilmetilo

Clasificación,

T+ ; R 28 | T ; R 24

Etiquetado,

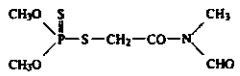
T+

R : 24-28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2540-82-1 | EEC No 219-818-6 | No 015-057-00-7



formotion (ISO); ditiofosfato de N-formil-N-metilcarbamoilmetilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

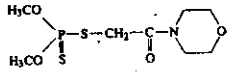
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 144-41-2 | EEC No 205-628-0 | No 015-058-00-2



morfotion; ditiofosfato de O,O-dimetilo y de S-(morfolinocarbonil)metilo

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

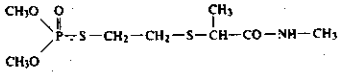
T

R: 23/24/25

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 2275-23-2 | EEC No 218-894-8 | No 015-059-00-8



vamidotion (ISO); tiofosfato de S-2-(1-metilcarbamoiletiltio) etilo y de dimetilo

Clasificación,

T; R 25 | Xn; R 21

Etiquetado,

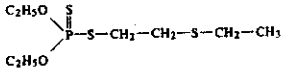
T

R: 21-25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 298-04-4 | EEC No 206-054-3 | No 015-060-00-3



disulfoton (ISO); ditiofosfato de O,O-dietilo y de S-2-etiltioetilo

Clasificación,

T+; R 27/28 | N; R 50-53

Etiquetado,

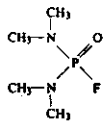
T+ N

R: 27/28-50/53

S: (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 115-26-4 | EEC No 204-076-8 | No 015-061-00-9



dimefox (ISO) ; fluoro tetrametilfosforodiamídico

Clasificación.

T+ ; R 27/28

Etiquetado.

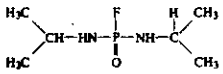
T+

R : 27/28

S : (1/2-)23-28-36/37-38-45

Límites de concentración.

Cas No 371-86-8 | EEC No 206-742-3 | No 015-062-00-4



mipafox ; fluoruro de N,N'-diisopropildiamidofosforilo

Clasificación.

T+ ; R 39/26/27/28

Etiquetado.

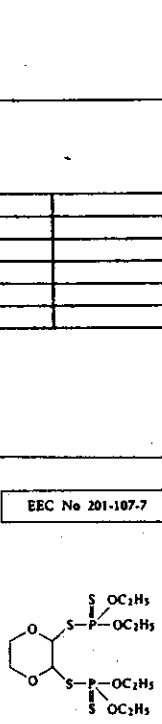
T+

R : 39/26/27/28

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración.

Cas No 78-34-2 | EEC No 201-107-7 | No 015-063-00-X



dioxation (ISO)(DCI) ; di(ditiofosfato) de 1,4-dioxano-2,3-diilo y de O,O,O',O'-tetraetilo

Clasificación.

T+ ; R 26/28 | T ; R 24

Etiquetado.

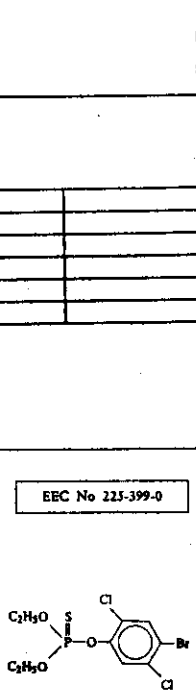
T+

R : 24-26/28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 4824-78-6 | EEC No 225-399-0 | No 015-064-00-5



bromofos-etil (ISO) ; tiofosfato de O-4-bromo-2,5-diclorofenilo y de O,O-dietilo

Clasificación.

T ; R 25 | Xn ; R 21 | N ; R 50-53

Etiquetado.

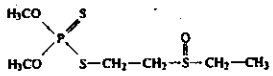
T N

R : 21-25-50/53

S : (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 2703-37-9 | EEC No — | No 015-065-00-0



ditiofosfato de O,O-dimetilo y de S-(2-etilsulfinil-etilo)

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado,

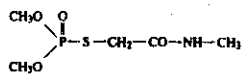
T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No 1113-02-6 | EEC No 214-197-8 | No 015-066-00-6



ometoato (ISO) ; tiofosfato de O,O-dimetilo y de S-metilcarbamoilmetilo

Clasificación,

T ; R 25	Xn ; R 21

Etiquetado,

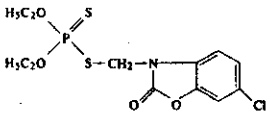
T

R : 21-25

S : (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2310-17-0 | EEC No 218-996-2 | No 015-067-00-1



fosalon ; ditiofosfato de O,O-dietilo y de S-(6-cloro-2-oxo-2H-benzo 1,3-3-oxazolil)metilo

Clasificación,

T ; R 25	Xn ; R 21

Etiquetado,

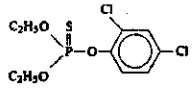
T

R : 21-25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 97-17-6 | EEC No 202-564-5 | No 015-068-00-7



diclofention (ISO) ; tiofosfato de O-2,4-diclorofenilo y de O,O-dietilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

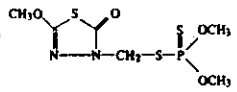
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 950-37-8	EEC No 213-449-4	No 015-069-00-2

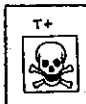


metidation (ISO); ditiofosfato de 2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tiadiazol-3-ilmetilo y O,O-dimetilo

Clasificación,

T+; R 28	Xn; R 21

Etiquetado,



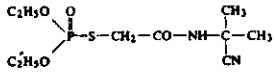
T+

R: 21-28

S: (1/2-)22-28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 3734-95-0	EEC No 223-099-4	No 015-070-00-8



cianfoxo (ISO); tiofosfato de S-N-(1-ciano-1-metiletil)carbamoilmetilo y de O,O-dietilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

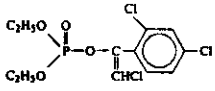
T+

R: 24-28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 470-90-6	EEC No 207-432-0	No 015-071-00-3



clorfenvinfos (ISO); fosfato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil) vinilo y de dietilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24	N; R 50-53

Etiquetado,

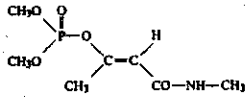
T+ N

R: 24-28-50/53

S: (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 6923-22-4	EEC No 230-042-7	No 015-072-00-9



monocrotofos (ISO); fosfato de dimetilo y 1-metil-2-(metilcarbamoil)vinilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

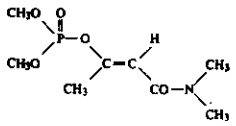
T+

R: 24-28

S: (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 141-66-2 | EEC No 205-494-3 | No 015-073-00-4



dicrotofos (ISO); fosfato de (Z)-2-dimetilcarbamoil-1-metilvinilo y de dimetilo

Clasificación,

T+ ; R 28 | T ; R 24

Etiquetado,

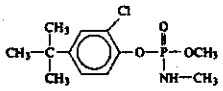
T+

R : 24-28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 299-86-5 | EEC No 206-083-1 | No 015-074-00-X



crufomato (ISO); metilfosforamidato de 4-terc-butil-2-clorofenilo y de metilo

Clasificación,

Xn ; R 21/22

Etiquetado,

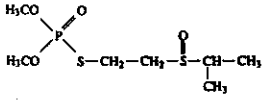
Xn

R : 21/22

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 2635-50-9 | EEC No — | No 015-075-00-5



tiofosfato de O,O-dimetilo y de S-(2-isopropilsulfinil-etilo)

Clasificación,

T ; R 23/24/25

Etiquetado,

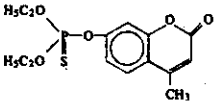
T

R : 23/24/25

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 299-45-6 | EEC No — | No 015-076-00-0



tiofosfato de O,O-dietilo y de O-(4-metil-7-cumarinilo)

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado,

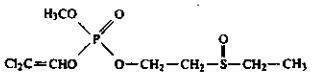
T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No 7076-53-1 | EEC No — | No 015-077-00-6



fosfato de metilo de 2,2-diclorovinilo y de 2-etilsulfinil-etilo

Clasificación,

T; R 23/24/25

Etiquetado,

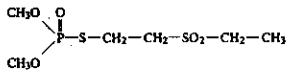
T

R: 23/24/25

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 17040-19-6 | EEC No 241-109-5 | No 015-078-00-1



demeton-S-metilsulfona; tiofosfato de S-2-etilsulfoniletilo y de dimetilo

Clasificación,

T; R 25 | Xn; R 21

Etiquetado,

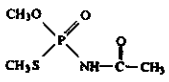
T

R: 21-25

S: (1/2-)22-28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 30560-19-1 | EEC No 250-241-2 | No 015-079-00-7



acefato (ISO); acetiltiofosforamidato de 0,S-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

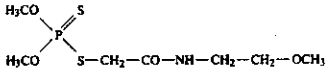
Xn

R: 22

S: (2-)36

Límites de concentración,

Cas No 919-76-6 | EEC No — | No 015-080-00-2



amidition (ISO); ditiofosfato de O,O-dimetilo y de 2-metoxietilcarbamoilmetilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

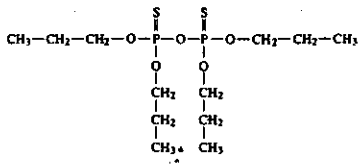
Xn

R: 22

S: (2-)24-36

Límites de concentración,

Cas No 3244-90-4 | EEC No 221-817-0 | No 015-081-00-8



ditiopirofosfato de O,O,O'O'-tetrapropilo

Clasificación,

Xn ; R 21/22

Etiquetado,

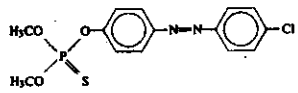
Xn

R : 21/22

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 5834-96-8 | EEC No 227-419-3 | No 015-082-00-3



azotosto ; tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-[4-(4-clorofenilazo)fenilo]

Clasificación,

Xn ; R 20/22

Etiquetado,

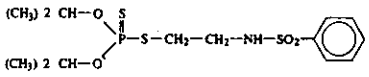
Xn

R : 20/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 741-58-2 | EEC No 212-010-4 | No 015-083-00-9



bensulida (ISO) ; ditiofosfato de 2-fenilsulfonamidoetilo y de O,O-diisopropilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

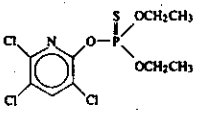
Xn

R : 22

S : (2-)24-36

Límites de concentración,

Cas No 2921-88-2 | EEC No 220-864-4 | No 015-084-00-4



clorpirifos (ISO) ; tiofosfato de O,O-dietilo y de O-3,5,6-tricloro-2-piridilo

Clasificación,

T ; R 24/25 | N ; R 50-53

Etiquetado,

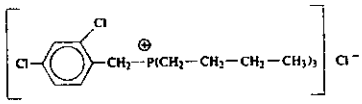
T N

R : 24/25-50/53

S : (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 115-78-6 | EEC No 204-105-4 | No 015-085-00-X



cloruro de clorfonio (ISO); cloruro de tributil (2,4-diclorobencil)fosfonio

Clasificación,

T; R 25	Xn; R 21	Xi; R 36/38

Etiquetado,

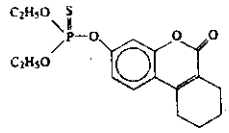
T

R: 21-25-36/38

S: (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 572-48-5 | EEC No — | No 015-086-00-5



cumitoato (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y de O-7,8,9,10-tetrahidro-6-oxobenzo(c)cromen-3-ilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

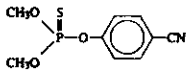
T

R: 25

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2636-26-2 | EEC No 220-130-3 | No 015-087-00-0



cianofos (ISO); tiofosfato de O-4-cianofenilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

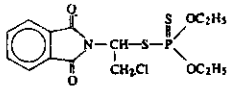
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 10311-84-9 | EEC No 233-689-3 | No 015-088-00-6



dislifos (ISO); ditiofosfato de 2-cloro-1-ftalimidoetilo y de O,O-dietilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

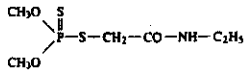
T+

R: 24-28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 116-01-8 | EEC No 204-121-1 | No 015-089-00-1



etoxo-metil (ISO); ditiofosfato de etilcarbamoilmetilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

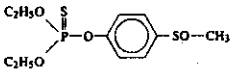
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 115-90-2 | EEC No 204-114-3 | No 015-090-00-7



fensulfotion (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y de O-4-metilsulfinilfenilo

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

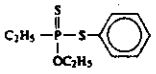
T+

R: 27/28

S: (1/2-)23-28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 944-22-9 | EEC No 213-408-0 | No 015-091-00-2



fonofos (ISO); etilditiofosfonato de O-etilo y de fenilo

Clasificación,

T+; R 27/28 | N; R 50-53

Etiquetado,

T+ N

R: 27/28-50/53

S: (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 4104-14-7 | EEC No 223-874-7 | No 015-092-00-8

fosacetima (ISO); N-acetimidoiltiofosforamidato de O,O-bis(4-clorofenilo)

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

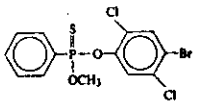
T+

R: 27/28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 21609-90-5 | EEC No 244-472-8 | No 015-093-00-3



leptofos (ISO); feniltiofosfonato de O-4-bromo-2,5-diclorofenilo y de O-metilo

Clasificación

T; R 25-39/25	Xn; R 21

Etiquetado

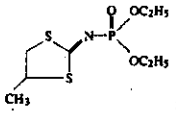
T

R: 21-25-39/25

S: (1/2-)25-36/37/39-45

Límites de concentración

Cas No 950-10-7 | EEC No 213-447-3 | No 015-094-00-9



metofolan (ISO); 4-metil-1,3-ditiolan-2-ilidenfosforamidato de dietilo

Clasificación

T+; R 27/28

Etiquetado

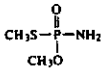
T+

R: 27/28

S: (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración

Cas No 10265-92-6 | EEC No 233-606-0 | No 015-095-00-4



metamidofos (ISO); tiofosforamidato de O,S-dimetilo

Clasificación

T+; R 28	T; R 24	Xi; R 36

Etiquetado

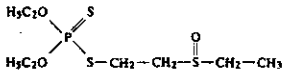
T+

R: 24-28-36

S: (1/2-)22-28-36/37-45

Límites de concentración

Cas No 2497-07-6 | EEC No 219-679-1 | No 015-096-00-X



oxidisulfoton; ditiofosfato de O,O-dietilo y de S-(2-etilsulfinil)etilo

Clasificación

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado

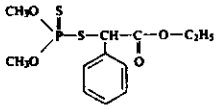
T+

R: 24-28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración

Cas No 2597-03-7 | EEC No 219-997-0 | No 015-097-00-5



fentoato (ISO); 2-(dimetoxifosfinotioiltio)-2-fenilacetato de etilo

Clasificación.

Xn; R\21/22

Etiquetado.

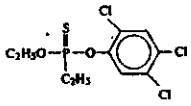
Xn

R: 21/22

S: (2-)22-36/37

Límites de concentración.

Cas No 327-98-0 | EEC No 206-326-1 | No 015-098-00-0



triclorona to (ISO); etiltiofosfonato de O-etilo y de O-(2,4,5-triclorofenilo)

Clasificación.

T+; R 28 | T; R 24

Etiquetado.

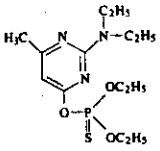
T+

R: 24-28

S: (1/2-)23-28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 23505-41-1 | EEC No 245-704-0 | No 015-099-00-6



pirimifos-etilo (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y de O-2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-ilo

Clasificación.

T; R 25 | Xn; R 21

Etiquetado.

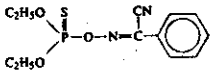
T

R: 21-25

S: (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 14816-18-3 | EEC No 238-887-3 | No 015-100-00-X



foxim (ISO)(DCI); alfa-(dietoxifosfinotioilimino)fenilacetonitrilo

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

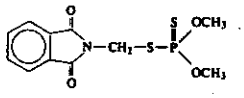
Xn

R: 22

S: (2-)36

Límites de concentración.

Cas No 732-11-6	EEC No 211-987-4	No 015-101-00-5



fosmet (ISO); ditiofosfato de ftalimidometilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

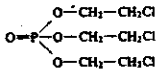
Xn

R: 21/22

S: (2-)22-36/37

Límites de concentración,

Cas No 115-96-8	EEC No 204-118-5	No 015-102-00-0



fosfato de tris(2-cloroetilo)

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/38

Etiquetado,

Xn

R: 22-36/38

S: (2)

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 22-36/38

Cas No 7789-60-8	EEC No 232-178-2	No 015-103-00-6

PBr_3

tribromuro de fósforo

Clasificación,

R 14	C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 1314-80-3	EEC No 215-242-4	No 015-104-00-1

P_2S_5

pentasulfuro de difósforo

Clasificación,

F; R 11	R 29	Xn; R 20/22

Etiquetado,

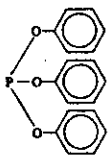
F Xn

R: 11-20/22-29

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 101-02-0 | EEC No 202-908-4 | No 015-105-00-7



fosfito de trifenilo

Clasificación,

Xi ; R 36/38

Etiquetado,

Xi

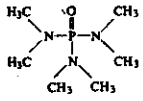
R : 36/38

S : (2-)28

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xi ; R 36/38

Cas No 680-31-9 | EEC No 211-653-8 | No 015-106-00-2



hexametiltriamida fosfórica

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Muta. Cat. 2 ; R 46

Etiquetado,

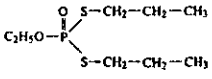
T

R : 45-46

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 13194-48-4 | EEC No 236-152-1 | No 015-107-00-8



etoprofos (ISO) ; ditiofosfato de etilo y de S,S-dipropilo

Clasificación,

T+ ; R 27	T ; R 25

Etiquetado,

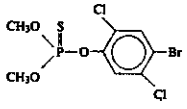
T+

R : 25-27

S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 2104-96-3 | EEC No 218-277-3 | No 015-108-00-3



bromofos (ISO) ; tiofosfato de O-4-bromo-2,5-diclorofenilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

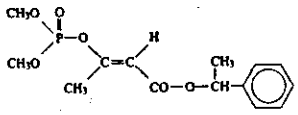
Xn

R : 22

S : (2-)36

Límites de concentración,

Cas No 7700-17-6 | EEC No 231-720-5 | No 015-109-00-9



crotoxifos (ISO); 3-(dimetoxifosfiniloxi) isocrotonato de 1-feniletilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

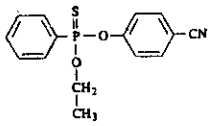
T

R: 24/25

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 13067-93-1 | EEC No — | No 015-110-00-4



cianofenfos (ISO); feniltiofosfonato de O-4-cianofenilo y de O-etilo

Clasificación,

T; R 25-39/25	Xn; R 21	Xi; R 36

Etiquetado,

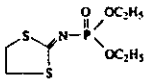
T

R: 21-25-36-39/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 947-02-4 | EEC No 213-423-2 | No 015-111-00-X



fosfolan (ISO); 1,3-ditiolan-2-ilidenfosforamidato de dietilo

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

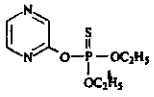
T+

R: 27/28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 297-97-2 | EEC No 206-049-6 | No 015-112-00-5



tiofosfato de O,O-dietilo y de O-pirazin-2-ilo; tionazina

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

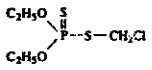
T+

R: 27/28

S: (1/2-)36/37/39-38-45

Límites de concentración,

Cas No 24934-91-6 | EEC No 246-538-1 | No 015-114-00-6



clormefos (ISO); ditiofosfato de S-clorometilo y de O,O-dietilo

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

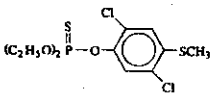
T+

R: 27/28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 21923-23-9 | EEC No 244-663-6 | No 015-115-00-1



clortiofos (ISO)

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

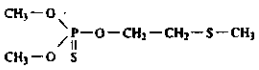
T+

R: 24-28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 682-80-4 | EEC No 211-666-9 | No 015-116-00-7



demeton-O (ISO); tiofosfato de O,O-dimetilo y de O-2-metiltioetilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

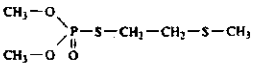
T+

R: 24-28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2587-90-8 | EEC No 219-971-9 | No 015-117-00-2



demeton-S (ISO); tiofosfato de O,O-dimetilo y de S-2-metiltioetilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

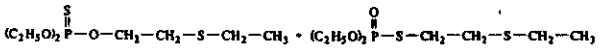
T+

R: 24-28

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 8065-48-3 | EEC No — | No 015-118-00-8



demeton

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

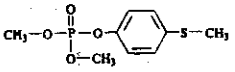
T+

R : 27/28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 3254-63-5 | EEC No — | No 015-119-00-3



fosfato de dimetilo y de 4-(metiltio)fenilo

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

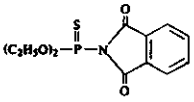
T+

R : 27/28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 5131-24-8 | EEC No 225-875-8 | No 015-120-00-9



ftalimidotiofosfonato de O,O-dietilo

Clasificación,

Xi ; R 38 | R 43

Etiquetado,

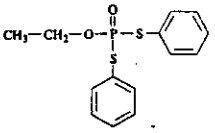
Xi

R : 38-43

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 17109-49-8 | EEC No 241-178-1 | No 015-121-00-4



edifenfos (ISO) ; ditiofosfato de O-etilo y de S,S-difenilo

Clasificación,

T ; R 23/24/25

Etiquetado,

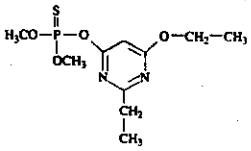
T

R : 23/24/25

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 38260-54-7 | EEC No 253-855-9 | No 015-122-00-X



tiofosfato de O-6-etoxi-2-etilpirimidin-4-ilo y de O,O-dimetilo; etrimfos

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

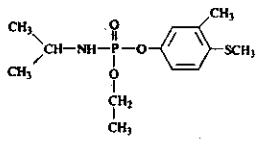
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 22224-92-6 | EEC No 244-848-1 | No 015-123-00-5



fenamifos (ISO); N-isopropilfosforamidato de etilo y de 4-metiltio-m-tolilo

Clasificación,

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado,

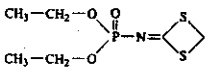
T+

R: 24-28

S: (1/2-)23-28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 21548-32-3 | EEC No 244-437-7 | No 015-124-00-0



1,3-ditietan-2-ilidenofosforamidato; fostietan

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

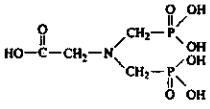
T+

R: 27/28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 2439-99-8 | EEC No 219-468-4 | No 015-125-00-6



glifosina (ISO); N,N-bis(fosfonometil)glicina

Clasificación,

Xi; R 41

Etiquetado,

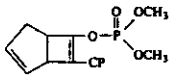
Xi

R: 41

S: (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 23560-59-0 | EEC No 245-737-0 | No 015-126-00-1



heptenofos (ISO); fosfato de 7-clorobiciclo(3.2.0)hepta-2,6-dien-6-ilo y de dimetilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

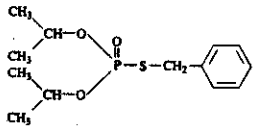
T

R: 25

S: (1/2-)23-28-37-45

Límites de concentración,

Cas No 26087-47-8 | EEC No 247-449-0 | No 015-127-00-7



tiofosfato de S-bencilo y de diisopropilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

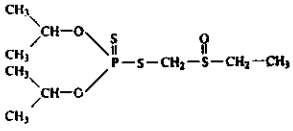
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 5827-05-4 | EEC No — | No 015-128-00-2



ditiofosfato de S-etilsulfinilmetilo y de O,O-diisopropilo

Clasificación,

T+; R 27 | T; R 25

Etiquetado,

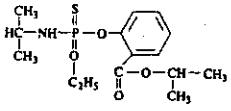
T+

R: 25-27

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 25311-71-1 | EEC No 246-814-1 | No 015-129-00-8



isofenfos (ISO); N-isopropiltiofosforamidato de O-etilo y de O-2-isopropoxicarbonilfenilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

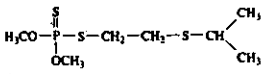
T

R: 24/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 36614-38-7 | EEC No — | No 015-130-00-3



ditiofosfato de S-2-isopropiltioetilo y de O,O-dimetilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

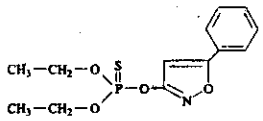
T

R: 24/25

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 18854-01-8 | EEC No 242-624-8 | No 015-131-00-9



tiofosfato de O,O-dietilo y de O-5-fenilisoxazol-3-ilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

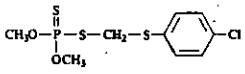
T

R: 24/25

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 953-17-3 | EEC No — | No 015-132-00-4



ditiofosfato de S-(clorofeniltiometilo) y de O,O-dimetilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

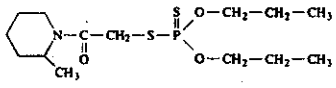
T

R: 24/25

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 24151-93-7 | EEC No — | No 015-133-00-X



piperofos (ISO); ditiofosfato de S-2-metilpiperidinocarbonilmetil-O,O-dipropilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

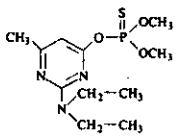
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 29232-93-7 | EEC No 249-528-5 | No 015-134-00-5



pirimifos-metil (ISO); tiofosfato de O-(2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-ilo) y de O,O-dimetilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

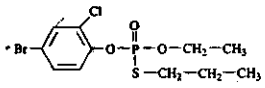
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 41198-08-7 | EEC No 255-255-2 | No 015-135-00-0



tiofosfato de O-(4-bromo-2-clorofenilo) de O-etilo y de S-propilo; profenofos

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

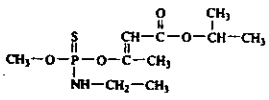
Xn

R: 20/21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 31218-83-4 | EEC No 250-517-2 | No 015-136-00-6



(etilamido)tiofosfato de O-etilo y de O-[(2-isopropoxicarbonil)-1-metil]vinilo

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

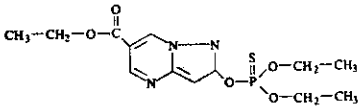
T

R: 25

S: (1/2-)37-45

Límites de concentración,

Cas No 13457-18-6 | EEC No 236-656-1 | No 015-137-00-1



pirazofos (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y de O-(6-etoxicarbonil-5-metilpirazolo(2,3-a)pirimidin-2-ilo)

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

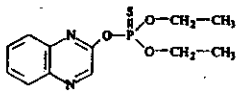
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 13593-03-8 | EEC No 237-031-6 | No 015-138-00-7



quinalfos (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y de O-quinoxalin-2-ilo

Clasificación,

T; R 25	Xn; R 21

Etiquetado,

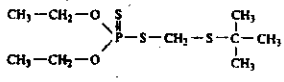
T

R: 21-25

S: (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 13071-79-9 | EEC No 235-963-8 | No 015-139-00-2



tiofosfato de S-terc-butiltiometilo y de O,O-dietilo; terbufos

Clasificación,

T+; R 27/28

Etiquetado,

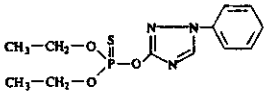
T+

R: 27/28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 24017-47-8 | EEC No 245-986-5 | No 015-140-00-8



triazofos (ISO); tiofosfato de O,O-dietilo y de O-1-fenil-1,2,4-triazol-3-ilo

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

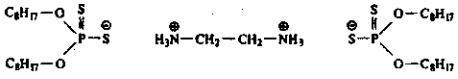
T

R: 24/25

S: (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-520-1 | No 015-141-00-3



ditiofosfato de etilendiamonio y O,O-bis(octilo), mezcla de isómeros

Clasificación,

C; R 34	Xn; R 22	N; R 50-53

Etiquetado,

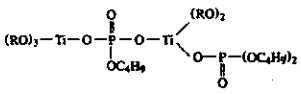
C N

R: 22-34-50/53

S: (1/2-)24/25-26-28-39-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 401-100-0	No 015-142-00-9



fosfato de butilo, dialquiloxi(dibutoxifosforiloxi)titanio y trialquiloxititanio

Clasificación,

F; R 11	Xi; R 36	N; R 51-53

Etiquetado,

F Xi N

R : 11-36-51/53

S : (2-)7/9-16-26-43-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 401-740-0	No 015-143-00-4

R_1 = —CH_2—CH_2—Cl
R_1 = —CH_2—CHCl—CH_3
R_2,R_3 = —CH_2—CH_2Cl
R_2,R_3 = —CH_2—CHCl—CH_3
R_2,R_3 = —CH(—CH_3)—CH_2Cl

Mezcla de.

2-cloroetilfosfonato de 2-cloroetilo y de cloropropilo, mezcla de isómeros

y

2-cloropropilfosfonato de 2-cloroetilo y de cloropropilo, mezcla de isómeros

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

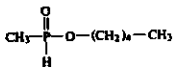
R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

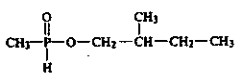
Cas No 87025-52-3	EEC No 402-090-0	No 015-144-00-X

Mezcla de,



metilfosfinato de pentilo

y



metilfosfinato de 2-metilbutilo

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R : 34

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 401-520-4	No 015-145-00-5

Mezcla de,

R es C_3H_7 y/o C_6H_{13}

ditiofosfato de cobre(I) y de O,O-diisopropilo

y

ditiofosfato de cobre(I), O-isopropilo y de O-(4-metilpent-2-ilo)

y

ditiofosfato de cobre(I) y de O,O-bis(4-metilpent-2-ilo)

Clasificación,

N; R 50-53

Etiquetado,

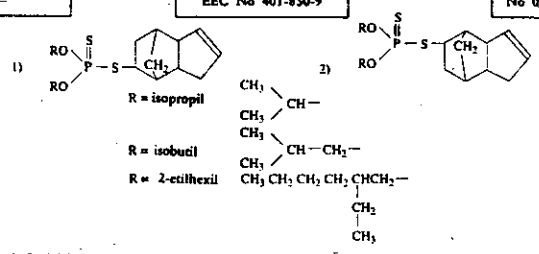
N

R : 50/53

S : 60-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 401-850-9	No 015-146-00-0



ditiofosfato de S-triciclo(5.2.1.0'2.6)deca-3-eno-8(o 9)-ilo, O-(isopropilo o isobutilo o 2-etilhexilo) y de O-(isopropilo o isobutilo o 2-etilhexilo)

Clasificación,

N ; R 50-53

Etiquetado,

N

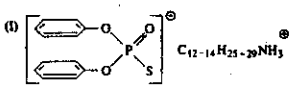
R : 50/53

S : 60-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 400-930-0	No 015-147-00-6

Mezcla de,



tiofosfato de C12-14-terc-alquilamonio y de difenilo

y,

(II)

$C_9H_{19}—S_{1,2}—C_9H_{19}$

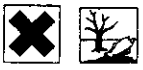
sulfuro (o disulfuro) de dinonilo

Clasificación,

Xi ; R 38-41	N ; R 51-53	R 43

Etiquetado,

Xi N



R : 38-41-43-51/53

S : (2-)24-26-37/39-61

Límites de concentración,

Cas No 7783-06-4	EEC No 231-977-3	No 016-001-00-4

H_2S

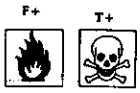
ácido sulfhídrico ; sulfuro de hidrógeno

Clasificación,

F+ ; R 12	T+ ; R 26

Etiquetado,

F+ T+



R : 12-26

S : (1/2-)7/9-16-45

Límites de concentración,

Cas No 21109-95-5	EEC No 244-214-4	No 016-002-00-X

BaS

sulfuro de bario

Clasificación,

R 31	Xn ; R 20/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/22-31

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 50864-67-0	EEC No 256-814-3	No 016-003-00-5

BaS_n

polisulfuros de bario

Clasificación,

R 31	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R : 31-36/37/38

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 20548-54-3	EEC No 243-873-5	No 016-004-00-0

CaS

sulfuro de calcio

Clasificación,

R 31	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R : 31-36/37/38

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 1344-81-6	EEC No 215-709-2	No 016-005-00-6

CaS_n

polisulfuros de calcio

Clasificación,

R 31	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R : 31-36/37/38

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 1312-73-8	EEC No 215-197-0	No 016-006-00-1

K_2S

sulfuro de potasio

Clasificación,

R 31	C ; R 34

Etiquetado,

C

R : 31-34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 37199-66-9	EEC No 253-390-1	No 016-007-00-7

K_2S_n

polisulfuros de potasio

Clasificación,

R 31	C; R 34

Etiquetado,

C

R : 31-34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 9080-17-5	EEC No 232-989-1	No 016-008-00-2

$(NH_4)_2S_n$

polisulfuros de amonio

Clasificación,

C; R 34	R 31

Etiquetado,

C

R : 31-34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	C; R 31-34
1 % ≤ C < 5 %	Xi; R 31-36/38

Cas No 1313-82-2	EEC No 215-211-5	No 016-009-00-8

Na_2S

sulfuro de sodio

Clasificación,

R 31	C; R 34

Etiquetado,

C

R : 31-34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 1344-08-7	EEC No 215-686-9	No 016-010-00-3

Na_2S_n

polisulfuros de sodio

Clasificación,

R 31	C; R 34

Etiquetado,

C

R : 31-34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 7446-09-5	EEC No 231-195-2	No 016-011-00-9

SO_2

dióxido de azufre

Clasificación,

T; R 23	Xi; R 36/37

Etiquetado,

T

R: 23-36/37

S: (1/2-)7/9-45

Límites de concentración,

Cas No 10025-67-9	EEC No 233-036-2	No 016-012-00-4

S_2Cl_2

dicloruro de diazufre

Clasificación,

R 14	C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 10545-99-0	EEC No 234-129-0	No 016-013-00-X

SCl_2

dicloruro de azufre

Clasificación,

R 14	C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 13451-08-6	EEC No —	No 016-014-00-5

SCl_4

tetracloruro de azufre

Clasificación,

R 14	C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 7719-09-7	EEC No 231-748-8	No 016-015-00-0

$SOCl_2$

cloruro de tionilo

Clasificación,

R 14	C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 7791-25-5	EEC No 232-245-6	No 016-016-00-6

SO_2Cl_2

cloruro de sulfurilo

Clasificación,

R 14	C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 7790-94-5	EEC No 232-234-6	No 016-017-00-1

HSO_3Cl

ácido clorosulfónico

Clasificación,

R 14	C; R 35	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-35-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 7789-21-1	EEC No 232-149-4	No 016-018-00-7

HSO_3F

ácido fluorosulfónico

Clasificación,

Xn; R 20	C; R 35

Etiquetado,

C

R: 20-35

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 016-019-00-2

NOTA B

$H_2SO_4 + SO_3$ 20% $SO_3 \leq$ conc $\leq$ 65% SO_3

oleum .. % SO_3; ácido sulfúrico fumante .. % SO_3

Clasificación,

R 14	C; R 35	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 14-35-37

S: (1/2-)26-30-45

Límites de concentración,

Cas No 7664-93-9	EEC No 231-639-5	No 016-020-00-8

NOTA B

H_2SO_4 .. %

ácido sulfúrico el .. %

Clasificación,

C; R 35

Etiquetado,

C

R: 35

S: (1/2-)26-30-45

Límites de concentración,

C ≥ 15%	C; R 35
5% ≤ C < 15%	Xi; R 36/38

Cas No 74-93-1	EEC No 200-822-1	No 016-021-00-3

CH_3SH

metanotiol; metilmercaptano

Clasificación,

F+; R 12	Xn; R 20

Etiquetado,

F+ Xn

R: 12-20

S: (2-)16-25

Límites de concentración,

Cas No 75-08-1	EEC No 200-837-3	No 016-022-00-9

C_2H_5SH

etanotiol; etilmercaptano

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20

Etiquetado,

F Xn

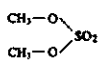
R: 11-20

S: (2-)16-25

Límites de concentración,

Cas No 77-78-1 | EEC No 201-058-1 | No 016-023-00-4

NOTA E



sulfato de dimetilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T+; R 26	T; R 25	C; R 34

Etiquetado,

T+

R: 45-25-26-34

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 1468-37-7 | EEC No 215-993-8 | No 016-024-00-X

dimexano; disulfuro de bis(metoxi-tiocarbonilo)

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

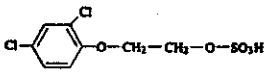
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 149-26-8 | EEC No 205-259-5 | No 016-025-00-5



diosul; sulfato ácido de 2-(2,4-diclorofenoxi)etilo

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 38-41

Etiquetado,

Xn

R: 22-38-41

S: (2)26

Límites de concentración,

Cas No 5329-14-6 | EEC No 226-218-8 | No 016-026-00-0

ácido sulfámico; ácido aminosulfónico

Clasificación,

Xi; R 36/38

Etiquetado,

Xi

R: 36/38

S: (2)26-28

Límites de concentración,

Cas No 64-67-5	EEC No 200-589-6	No 016-027-00-6

NOTA E

sulfato de dietilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	Muta. Cat. 2; R 46	Xn; R 20/21/22	C; R 34

Etiquetado,

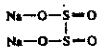
T

R: 45-46-20/21/22-34

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7775-14-6	EEC No 231-890-0	No 016-028-00-1



ditionito de sodio; hidrosulfito de sodio

Clasificación,

R 7	R 31	Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

R: 7-22-31

S: (2-)7/8-26-28-43

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 016-029-00-7

ácido p-toluensulfónico, conteniendo más del 5 % de H_2SO_4

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 36/38

Cas No 104-15-4	EEC No 203-180-0	No 016-030-00-2

ácido p-toluenosulfónico (con un contenido máximo de 5 % de H_2SO_4)

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R: 36/37/38

S: (2-)26-37

Límites de concentración,

C ≥ 20%	Xi; R 36/37/38

Cas No 126-33-0 | EEC No 204-783-1 | No 016-031-00-8

1,1-dióxido de tetrahidrotiofeno; sulfolan

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

R: 22

S: (2-)25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 22

Cas No 1120-71-4 | EEC No 214-317-9 | No 016-032-00-3

NOTA E

1,3-propanosultona

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	Xn; R 21/22

Etiquetado,

T

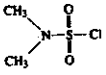
R: 45-21/22

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 13360-57-1 | EEC No 236-412-4 | No 016-033-00-9

NOTA E



cloruro de dimetilsulfamoilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T+; R 26	Xn; R 21/22	C; R 34

Etiquetado,

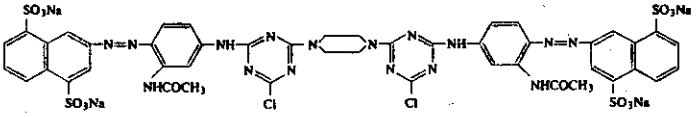
T

R: 45-21/22-26-34

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 81898-60-4 | EEC No 408-010-9 | No 016-034-00-4



3,3'-(piperazina-1,4-diilbis((6-cloro-1,3,5-triazina-4,2-diil)imino(2-acetamido)-4,1-fenilenazo))bis(naftaleno-1,5-disulfonato) de tetrasodio

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

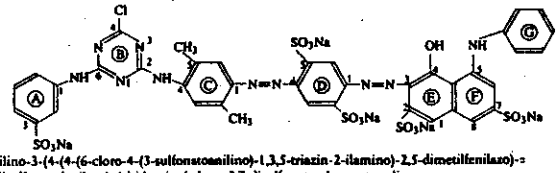
Xi

R: 43

S: (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 400-120-7	No 016-035-00-X



5-anilino-3-(4-(4-(6-cloro-4-(3-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2,5-dimetilfenilazo)-2,5-disulfonatofenilazo)-4-hidroxinaftaleno-2,7-disulfonato de pentasodio

Clasificación,

Xi ; R 36

Etiquetado,

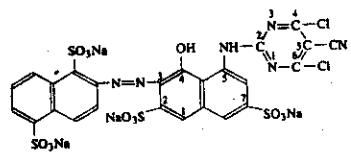
Xi

R : 36

S : (2-)22-26

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 400-130-1	No 016-036-00-5



5'-(5-ciano-4,6-dicloropirimidin-2-ilamino)-4'-hidroxi-2,3'-azodinaftaleno-1,2',5,7'-disulfonato de tetrasodio

Clasificación,

R 42	N ; R 51-53

Etiquetado,

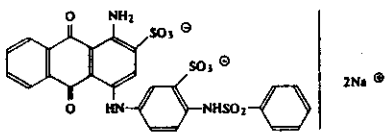
Xn N

R : 42-51/53

S : (2-)22-61

Límites de concentración,

Cas No 85153-93-1	EEC No 400-350-8	No 016-037-00-0



1-amino-4-(4-bencenosulfonamido-3-sulfonatoanilino)antraquinona-2-sulfonato de disodio

Clasificación,

Xi ; R 41	R 52-53

Etiquetado,

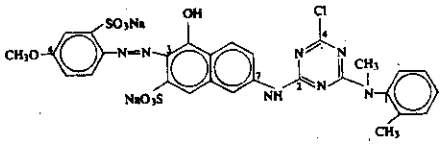
Xi

R : 41-52/53

S : (2-)26-39-61

Límites de concentración,

Cas No 86393-35-3	EEC No 400-380-1	No 016-038-00-6



6-[(4-cloro-6-(N-metil)-2-toluidino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-1-hidroxi-2-(4-metoxi-2-sulfonatofenilazo)naftaleno-3-sulfonato de disodio

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

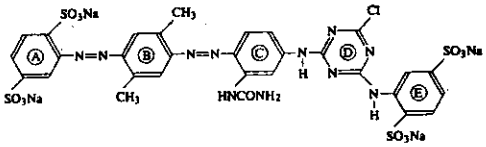
S : (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 400-430-2

No 016-039-00-1



2-(6-cloro-4-(4-(2,5-dimetil-4-(2,5-disulfonatofenilazo)fenilazo)-3-ureidoanilino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)benceno-o 1,4-disulfonato de tetrasodio

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

S : (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 400-570-4

No 016-040-00-7

Mezcla de,

6-(2,4-dihidroxifenilazo)-3-(4-(4-(2,4-dihidroxifenilazo)anilino)-3-sulfonatofenilazo)-4-hidroxinaftaleno-2-sulfonato de disodio

y

6-(2,4-diaminofenilazo)-3-(4-(4-(2,4-diaminofenilazo)anilino)-3-sulfonatofenilazo)-4-hidroxinaftaleno-2-sulfonato de disodio

y

6-(2,4-dihidroxifenilazo)-3-(4-(4-(7-(2,4-dihidroxifenilazo)-1-hidroxi-3-sulfonato-2-naftilazo)anilino)-o 3-sulfonatofenilazo)-4-hidroxinaftaleno-2-sulfonato de trisodio

Clasificación,

Xi ; R 36

Etiquetado,

Xi

R : 36

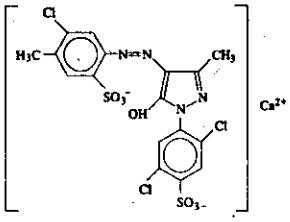
S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 400-710-4

No 016-041-00-2



2,5-dicloro-4-(4-((5-cloro-4-metil-2-sulfonatofenil)azo)-5-hidroxi-3-metilpirazol-1-il)bencensulfonato de calcio

Clasificación,

Xn ; R 20

Etiquetado,

Xn

R : 20

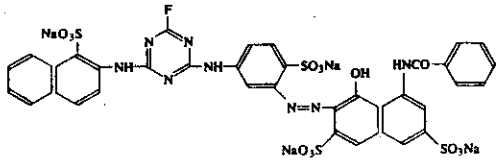
S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 85665-97-0

EEC No 400-790-0

No 016-042-00-8



5-benzamido-3-(5-(4-fluoro-6-(1-sulfonato-2-naftilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-sulfonatofenilazo)-o 4-hidroxinaftaleno-2,7-disulfonato de tetrasodio

Clasificación.

Xi ; R 36/38 | R 43

Etiquetado.

Xi

R : 36/38-43

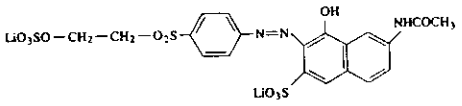
S : (2-)22-24/25-37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 401-010-1

No 016-043-00-3



6-acetamido-4-hidroxi-3-(4-((2-sulfonatooxi)etilsulfonil)fenilazo)naftaleno-2-sulfonato de dilitio

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

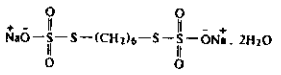
S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 401-320-7

No 016-044-00-9



S,S'-hexano-1,6-diildi(tiosulfato) de disodio, dihidrato

Clasificación,

R 43 | R 52-53

Etiquetado,

Xi

R : 43-52/53

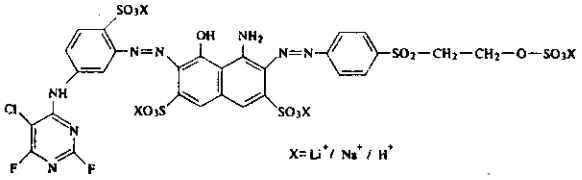
S : (2-)22-24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 108624-00-6

EEC No 401-560-2

No 016-045-00-4



X= Li^+ / Na^+ / H^+

4-amino-6-(5-(5-cloro-2,6-difluoropirimidin-4-ilamino)-2-sulfonatofenilazo)-5-hidroxi-3-(4-(2-(sulfonatooxi)-etilsulfonil)fenilazo)naftaleno-2,7-disulfonato de litio y de sodio y de hidrogeno

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

S : (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No 7681-38-1

EEC No 231-665-7

No 016-046-00-X

$H_2O_4S.Na$

hidrogenosulfato de sodio

Clasificación,

C ; R 34 | Xi ; R 37

Etiquetado,

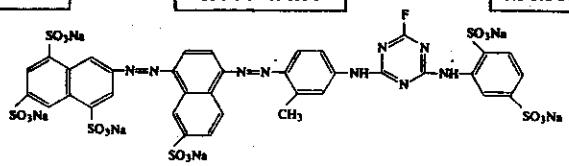
C

R : 34-37

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 85665-96-9 | EEC No 401-650-1 | No 016-047-00-5



7-(4-(4-(4-(2,5-disulfonatoanilino)-6-fluoro-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-metilfenilazo)-7-sulfonatonaftilazo)naftaleno-o 1,3,5-trisulfonato de hexasodio

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

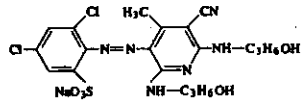
Xi

R : 43

S : (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 401-870-8 | No 016-048-00-0



3,5-dicloro-2-(5-ciano-2,6-bis(3-hidroxipropilamino)-4-metilpiridin-3-ilazo)bencensulfonato de sodio

Clasificación,

Xi ; R 41 | R 52-53

Etiquetado,

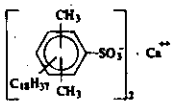
Xi

R : 41-52/53

S : (2-)26-61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 402-040-8 | No 016-049-00-6



octadecilbencensulfonato de calcio

Clasificación,

C ; R 34 | N ; R 51-53

Etiquetado,

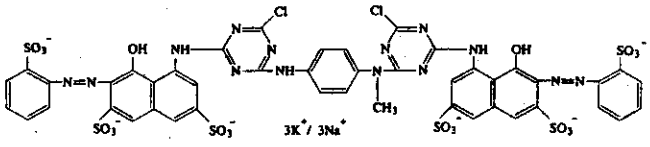
C N

R : 34-51/53

S : (1/2-)26-28-36/37/39-45-61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 402-150-6 | No 016-050-00-1



5-(4-cloro-6-(N-(4-(4-cloro-6-(5-hidroxi-2,7-disulfonato-6-(2-sulfonatofenilazo)-4-naftilamino)-1,3,5-triazin-e 2-ilamino)fenil-N-metil) amino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-hidroxi-3-(2-sulfonatofenilazo)naftaleno-2,7-disulfonato di potasio y sodio

Clasificación,

Xi ; R 36 | R 43

Etiquetado,

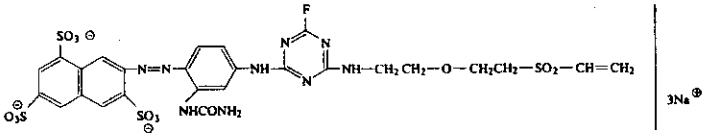
Xi

R : 36-43

S : (2-)22-24-26-37

Límites de concentración,

Cas No 106359-91-5	EEC No 402-170-5	No 016-051-00-7



7-(4-(6-fluoro-4-(2-(2-vinilsulfoniletoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-ureidofenilazo)naftaleno-o 1,3,6-trisulfonato de trisodio

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

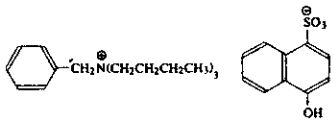
Xi

R : 43

S : (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No 102561-46-6	EEC No 402-240-5	No 016-052-00-2



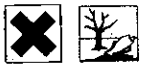
4-hidroxinaftaleno-1-sulfonato de benciltributilamonio

Clasificación,

Xn ; R 20	N ; R 51-53

Etiquetado,

Xn N

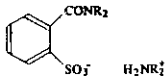


R : 20-51/53

S : (2-)22-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 402-460-1	No 016-053-00-8



R = $C_{16}H_{33}$ / $C_{18}H_{37}$

2-((C16 o C18-n-alquil)(C16 o C18-n-alquil)carbamoil)bencensulfonato de (C16 o C18-n-alquil)(C16 o C18-n-alquil)amonio

Clasificación,

Xi ; R 38	R 43	R 53

Etiquetado,

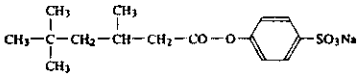
Xi

R : 38-43-53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 400-030-8	No 016-054-00-3



4-(2,4,4-trimetilpentilcarboniloxi)bencenosulfonato de sodio

Clasificación,

T ; R 23-48/23	Xn ; R 22	Xi ; R 36/37	R 43

Etiquetado,

T

R : 22-23-36/37-43-48/23

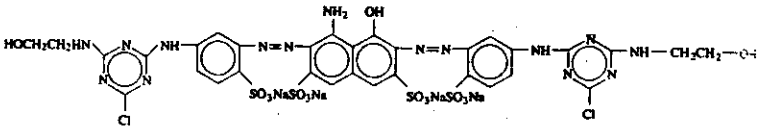
S : (1/2-)22-24-36-45

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 408-510-7

No 016-055-00-9



4-amino-3,6-bis(5-(6-cloro-4-(2-hidroxietilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-sulfonatofenilazo)-5-hidroxinaftaleno-2,7-sulfonato de tetrasodio (conteniendo > 35 % de cloruro y de acetato de sodio)

Clasificación,

Xi; R 41	R 43

Etiquetado,

Xi

R: 41-43

S: (2-)22-24-26-37/39

Límites de concentración,

Cas No 7646-93-7

EEC No 231-594-1

No 016-056-00-4

$H_2O_4S.K$

hidrogenosulfato de potasio

Clasificación,

C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 34-37

S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 7782-50-5

EEC No 231-959-5

No 017-001-00-7

Cl_2

cloro

Clasificación,

T; R 23	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

T

R: 23-36/37/38

S: (1/2-)7/9-45

Límites de concentración,

Cas No 7647-01-0

EEC No 231-595-7

No 017-002-00-2

HCl

ácido clorhídrico, anhidro; cloruro de hidrógeno, anhidro

Clasificación,

C; R 35	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 35-37

S: (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 231-595-7	No 017-002-01-X

NOTA B

HCl _ %

ácido clorhídrico .. % ; cloruro de hidrógeno... %

Clasificación,

C ; R 34	Xi ; R 37

Etiquetado,

C

R : 34-37

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 34-37
10 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 13477-00-4	EEC No 236-760-7	No 017-003-00-8

$Ba(ClO_3)_2$

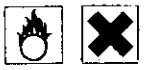
clorato de bario

Clasificación,

O ; R 9	Xn ; R 20/22

Etiquetado,

O Xn



R : 9-20/22

S : (2-)13-27

Límites de concentración,

Cas No 3811-04-9	EEC No 223-289-7	No 017-004-00-3

$KClO_3$

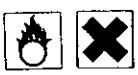
clorato de potasio

Clasificación,

O ; R 9	Xn ; R 20/22

Etiquetado,

O Xn



R : 9-20/22

S : (2-)13-16-27

Límites de concentración,

Cas No 7775-09-9	EEC No 231-887-4	No 017-005-00-9

$NaClO_3$

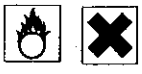
clorato de sodio

Clasificación,

O ; R 9	Xn ; R 22

Etiquetado,

O Xn



R : 9-22

S : (2-)13-17-46

Límites de concentración,

Cas No 7601-90-3	EEC No 231-512-4	No 017-006-00-4

NOTA B

$HClO_4$ _ %

ácido perclórico _ %

Clasificación,

R 5	O; R 8	C; R 35

Etiquetado,

O C

R : 5-8-35

S : (1/2-)23-26-36-45

Límites de concentración,

C ≥ 50 %	C; R 35
10 % ≤ C < 50 %	C; R 34
1 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/38

O

C ≥ 50 % ; R 5-8

Cas No 13465-95-7	EEC No 236-710-4	No 017-007-00-X

$Ba(ClO_4)_2$

perclorato de bario

Clasificación,

O; R 9	Xn; R 20/22

Etiquetado,

O Xn

R : 9-20/22

S : (2-)27

Límites de concentración,

Cas No 7778-74-7	EEC No 231-912-9	No 017-008-00-5

$KClO_4$

perclorato de potasio

Clasificación,

O; R 9	Xn; R 22

Etiquetado,

O Xn

R : 9-22

S : (2-)13-22-27

Límites de concentración,

Cas No 7790-98-9	EEC No 232-235-1	No 017-009-00-0

NOTA G

NH_4ClO_4

perclorato de amonio

Clasificación,

O; R 9	R 44

Etiquetado,

O

R : 9-44

S : (2-)14-16-27-36/37

Límites de concentración,

Cas No 7601-89-0	EEC No 231-511-9	No 017-010-00-6

$NaClO_4$

perclorato de sodio

Clasificación,

O; R 9	Xn; R 22

Etiquetado,

O Xn

R : 9-22

S : (2-)13-22-27

Límites de concentración,

Cas No 7681-52 9	EEC No 231-668-3	No 017-011-00-1

NOTA B

NaOCl .. % Cl activo

hipoclorito de sodio, solución .. % cloro activo

Clasificación,

C; R 34	R 31

Etiquetado,

C

R : 31-34

S : (1/2-)28-45-50

Límites de concentración,

C > 10 % ()	C; R 31-34
5 % ≤ C ≤ 10 % ()	Xi; R 31-36/38

() % Cl activo

Cas No 7778-54-3	EEC No 231-908-7	No 017-012-00-7

$Ca(OCl)_2$ .. % Cl activo > 39 %

hipoclorito de calcio, solución .. % cloro activo

Clasificación,

O; R 8	R 31	C; R 34

Etiquetado,

O C

R : 8-31-34

S : (1/2-)26-43-45

Límites de concentración,

Cas No 10043-52-4	EEC No 233-140-8	No 017-013-00-2

$CaCl_2$

cloruro de calcio

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R : 36

S : (2-)22-24

Límites de concentración,

Cas No 12125-02-9	EEC No 235-186-4	No 017-014-00-8

NH_4Cl

cloruro de amonio

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36

Etiquetado,

Xn

R : 22-36

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 7440-09-7	EEC No 231-119-8	No 019-001-00-2

K

potasio

Clasificación,

R 14	F; R 15	C; R 34

Etiquetado,

F C

R : 14/15-34

S : (1/2-)5'-8-45

S 5 no debe ser utilizada si se emplea otro embalaje de seguridad.

Límites de concentración,

Cas No 1310-58-3	EEC No 215-181-3	No 019-002-00-8

KOH

hidróxido de potasio ; potasa cáustica

Clasificación,

C; R 35

Etiquetado,

C

R : 35

S : (1/2-)26-37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	C; R 35
2 % ≤ C < 5 %	C; R 34
0,5 % ≤ C < 2 %	Xi; R 36/38

Cas No 7440-70-2	EEC No 231-179-5	No 020-001-00-X

Ca

calcio

Clasificación,

F; R 15

Etiquetado,

F

R : 15

S : (2-)8-24/25-43

Límites de concentración,

Cas No 592-01-8	EEC No 209-740-0	No 020-002-00-5

$Ca^{++}(CN^{-})_2$

cianuro de calcio

Clasificación,

T+ ; R 28	R 32

Etiquetado,

T+

R : 28-32

S : (1/2-)7/8-23-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 7550-45-0	EEC No 231-441-9	No 022-001-00-5

$TiCl_4$

tetracloruro de titanio

Clasificación,

R 14	C ; R 34	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

C

R : 14-34-36/37

S : (1/2-)7/8-26-45

Límites de concentración,

Cas No 1314-62-1	EEC No 215-239-8	No 023-001-00-8

V_2O_5

pentóxido de divanadio

Clasificación,

Xn ; R 20

Etiquetado,

Xn

R : 20

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 1333-82-0	EEC No 215-607-8	No 024-001-00-0

NOTA E

CrO_3

trióxido de cromo

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 49	O ; R 8	T ; R 25	C ; R 35	R 43

Etiquetado,

O T

R : 49-8-25-35-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7778-50-9	EEC No 231-906-6	No 024-002-00-6

$K_2Cr_2O_7$

dicromato de potasio

Clasificación,

Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado,

Xi

R: 36/37/38-43

S: (2-)22-28

Límites de concentración,

NOTA 3

C ≥ 20 %	Xi; R 36/37/38-43
0,5 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 7789-09-5	EEC No 232-143-1	No 024-003-00-1

$(NH_4)_2Cr_2O_7$

dicromato de amonio

Clasificación,

O; R 8	E; R 1	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado,

E Xi

R: 1-8-36/37/38-43

S: (2-)28-35

Límites de concentración,

NOTA

C ≥ 20 %	Xi; R 36/37/38-43
0,5 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 10588-01-9	EEC No 234-190-3	No 024-004-00-7

$Na_2Cr_2O_7$

dicromato de sodio

Clasificación,

Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado,

Xi

R: 36/37/38-43

S: (2-)22-28

Límites de concentración,

NOTA 3

C ≥ 20 %	Xi; R 36/37/38-43
0,5 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 14977-61-8	EEC No 239-056-8	No 024-005-00-2

CrO_2Cl_2

oxicloruro de cromo

Clasificación,

O; R 8	C; R 35

Etiquetado,

O C

R: 8-35

S: (1/2-)7/8-22-28-45

Límites de concentración,

Cas No 7789-00-6	EEC No 232-140-5	No 024-006-00-8

K_2CrO_4

cromato de potasio

Clasificación,

Xi ; R 36/37/38	R 43

Etiquetado,

Xi

R : 36/37/38-43

S : (2-)22-28

Límites de concentración,

NOTA 3

C ≥ 20 %	Xi ; R 36/37/38-43
0,5 % ≤ C < 20 %	Xi ; R 43

Cas No —	EEC No —	No 024-007-00-3

NOTA A

NOTA E

cromatos de cinc, incluido el cromato de cinc y de potasio

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 22	R 43

Etiquetado,

T

R : 45-22-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 13765-19-0	EEC No 237-366-8	No 024-008-00-9

NOTA E

$CaCrO_4$

cromato de calcio

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7789-06-2	EEC No 232-142-6	No 024-009-00-4

NOTA E

$SrCrO_4$

cromato de estroncio

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 24613-89-6 | EEC No 246-356-2 | No 024-010-00-X

$Cr_2(CrO_4)_3$

cromato de cromo III; cromato crómico; sal de cromo III del ácido crómico VI

Clasificación,

O; R 8	Carc. Cat. 2; R 45	C; R 35	R 43

Etiquetado,

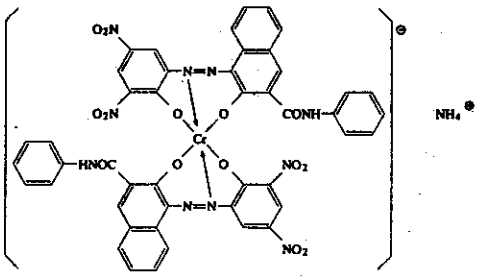
O T C

R: 45-8-35-43

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-110-2 | No 024-011-00-5



bis(1-(3,5-dinitro-2-óxidofenilazo)-3-(N-fenilcarbamoil)-2-naftolato)cromato(1-) de amonio

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

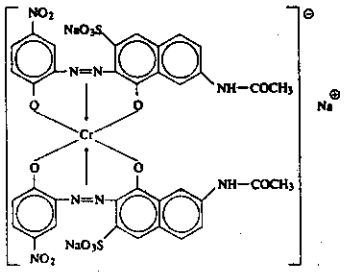
F

R: 11

S: (2-)33

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-810-8 | No 024-012-00-0



bis(7-acetamido-2-(4-nitro-2-óxidofenilazo)-3-sulfonato-1-naftolato)cromato(1-) de trisodio

Clasificación,

Muta. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

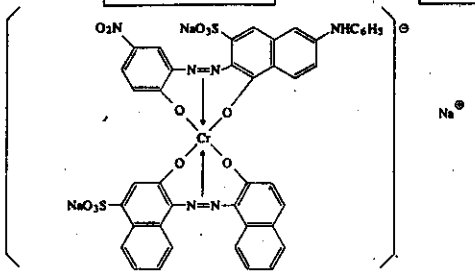
Xn

R: 40

S: (2-)22-36/37

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 402-500-8 | No 024-013-00-6



(6-anilino-2-(5-nitro-2-óxidofenilazo)-3-sulfonato-1-naftolato)(4-sulfonato-1,1'-azodi-2,2'naftolato)cromato(1-) de trisodio

Clasificación,

Xi; R 41	N; R 51-53

Etiquetado,

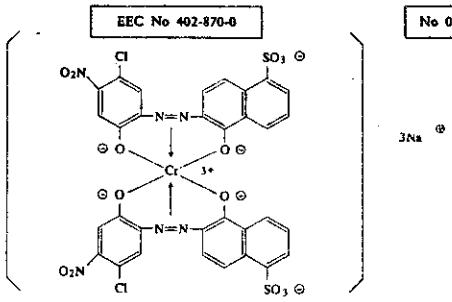
Xi N

R: 41-51/53

S: (2-)26-39-61

Límites de concentración,

Cas No 93952-24-0 | EEC No 402-870-0 | No 024-014-00-1



bis(2-(5-cloro-4-nitro-2-óxidofenilazo)-5-sulfonato-1-naftolato)cromato(1-) de trisodio

Clasificación,

Xi ; R 41	R 52-53

Etiquetado,

Xi

R : 41-52/53

S : (2-)26-39-61

Límites de concentración,

Cas No 1313-13-9 | EEC No 215-202-6 | No 025-001-00-3

MnO_2

dióxido de manganeso

Clasificación,

Xn ; R 20/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/22

S : (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 7722-64-7 | EEC No 231-760-3 | No 025-002-00-9

$KMnO_4$

permanganato de potasio

Clasificación,

O ; R 8	Xn ; R 22

Etiquetado,

O Xn

R : 8-22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 7785-87-7 | EEC No 232-089-9 | No 025-003-00-4

H_2O_5Mn

sulfato de manganeso

Clasificación,

Xn ; R 48/20/22

Etiquetado,

Xn

R : 48/20/22

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 7440-48-4	EEC No 231 158-0	No 027-001-00-9

Co

cobalto

Clasificación,

R 42/43

Etiquetado,

Xn

R : 42/43

S : (2-)22-24-37

Límites de concentración,

Cas No 1307-96-6	EEC No 215-154-6	No 027-002-00-4

CoO

óxido de cobalto

Clasificación,

Xn ; R 22	R 43

Etiquetado,

Xn

R : 22-43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 1317-42-6	EEC No 215-273-3	No 027-003-00-X

CoS

sulfuro de cobalto

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 13463-39-3	EEC No 236-669-2	No 028-001-00-1

NOTA E

$Ni(CO)_4$

niquel tetracarbonilo ; niquel carbonilo

Clasificación.

F ; R 11	Carc. Cat. 3 ; R 40	Repr. Cat. 2 ; R 61	T+ ; R 26

Etiquetado,

F T+

R : 61-11-26-40

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7440-02-0 | EEC No 231-111-4 | No 028-002-00-7

Ni

niquel

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	R 43

Etiquetado.

Xn

R : 40-43

S : (2-)22-36

Límites de concentración.

Cas No 1313-99-1 | EEC No 215-215-7 | No 028-003-00-2

NiO

monóxido de niquel

Clasificación.

Carc. Cat. 1 ; R 49	R 43

Etiquetado.

T

R : 49-43

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 12035-36-8 | EEC No 234-823-3 | No 028-004-00-8

NiO_2

dióxido de niquel

Clasificación.

Carc. Cat. 1 ; R 49	R 43

Etiquetado.

T

R : 49-43

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 1314-06-3 | EEC No 215-217-8 | No 028-005-00-3

Ni_2O_3

trióxido de diniquel

Clasificación.

Carc. Cat. 1 ; R 49	R 43

Etiquetado.

T

R : 49-43

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 16812-54-7	EEC No 240-841-2	No 028-006-00-9

NiS

sulfuro de níquel

Clasificación.

Carc. Cat. 1 ; R 49	R 43

Etiquetado.

T

R : 49-43

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 12035-72-2	EEC No 234-829-6	No 028-007-00-4

Ni_3S_2

disulfuro de triníquel

Clasificación.

Carc. Cat. 1 ; R 49	R 43

Etiquetado.

T

R : 49-43

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 12054-48-7	EEC No 235-008-5	No 028-008-00-X

$Ni(OH)_2$

dihidróxido de níquel

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 20/22	R 43

Etiquetado.

Xn

R : 20/22-40-43

S : (2-)22-36

Límites de concentración.

Cas No 7786-81-4	EEC No 232-104-9	No 028-009-00-5

$NiSO_4$

sulfato de níquel

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 22	R 42/43

Etiquetado.

Xn

R : 22-40-42/43

S : (2-)22-36/37

Límites de concentración.

Cas No 3333-67-3	EEC No 222-068-2	No 028-010-00-0

$NiCO_3$

carbonato de níquel

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 22	R 43

Etiquetado.

Xn

R : 22-40-43

S : (2-)22-36/37

Límites de concentración.

Cas No 7758-89-6	EEC No 231-842-9	No 029-001-00-4

CuCl

cloruro de cobre (I)

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración.

Cas No 1317-39-1	EEC No 215-270-7	No 029-002-00-X

Cu_2O

óxido de cobre (I) ; óxido cuproso

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración.

Cas No 1338-02-9	EEC No 215-657-0	No 029-003-00-5

naftenato de cobre

Clasificación.

R 10	Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 10-22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 7758-98-7 | EEC No 231-847-6 | No 029-004-00-0

$CuSO_4$

sulfato de cobre

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/38

Etiquetado,

Xn

R: 22-36/38

S: (2-)22

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 401-260-1 | No 029-005-00-6

(tris(clorometil)ftalocianinato)cobre(II), productos de reacción con N-metilpiperazina y ácido metoxiacético

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R: 36

S: (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 7440-66-6 | EEC No 231-175-3 | No 030-001-00-1

Zn

cinc en polvo (pirofórico)

Clasificación,

F; R 15-17

Etiquetado,

F

R: 15-17

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 030-002-00-7

Zn

cinc en polvo (estabilizado)

Clasificación,

R 10	F; R 15

Etiquetado,

R: 10-15

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No 7646-85-7	EEC No 231-592-0	No 030-003-00-2

$ZnCl_2$

cloruro de cinc

Clasificación,

C ; R 34

Etiquetado,

C

R : 34

S : (1/2-)7/8-28-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 030-004-00-8

NOTA A

$Zn(C_nH_{2n+1})_2$ $n = 1 - 5$

derivados de alquilcinc

Clasificación,

R 14	F ; R 17	C ; R 34

Etiquetado,

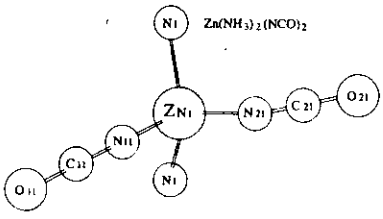
F C

R : 14-17-34

S : (1/2-)16-43-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 401-610-3	No 030-005-00-3



diaminodiisocianatocinc

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 41	R 42/43	N ; R 50

Etiquetado,

Xn N

R : 22-41-42/43-50

S : (2-)22-26-36/37/39-41-61

Límites de concentración,

Cas No 7733-02-0	EEC No 231-793-3	No 030-006-00-9

$H_2O_4S.Zn$

sulfato de cinc

Clasificación,

Xi ; R 36/38

Etiquetado,

Xi

R : 36/38

S : (2-)22-25

Límites de concentración,

Cas No 7440-38-2	EEC No 231-148-6	No 033-001-00-X

As

arsénico

Clasificación,

T; R 23/25

Etiquetado,

T

R: 23/25

S: (1/2-)20/21-28-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 033-002-00-5

NOTA A

compuestos de arsénico, exceptos aquellos que expresamente están indicados en este Anexo

Clasificación,

T; R 23/25

Etiquetado,

T

R: 23/25

S: (1/2-)20/21-28-45

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 0,2 %	T; R 23/25
0,1 % ≤ C < 0,2 %	Xn; R 20/22

Cas No 1327-53-3	EEC No 215-481-4	No 033-003-00-0

NOTA E

As_2O_3

trióxido de diarsénico; trióxido de arsénico

Clasificación,

Carc. Cat. 1; R 45	T+; R 28	C; R 34

Etiquetado,

T+

R: 45-28-34

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 1303-28-2	EEC No 215-116-9	No 033-004-00-6

NOTA E

As_2O_5

pentóxido de diarsénico

Clasificación,

Carc. Cat. 1; R 45	T; R 23/25

Etiquetado,

T

R: 45-23/25

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 033-005-00-1

NOTA A

NOTA E

AsH_3O_4

ácido arsénico y sus sales

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	T ; R 23/25

Etiquetado,

T

R : 45-23/25

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7782-49-2	EEC No 231-957-4	No 034-001-00-2

Se

selenio

Clasificación,

T ; R 23/25	R 33

Etiquetado,

T

R : 23/25-33

S : (1/2-)20/21-28-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 034-002-00-8

NOTA A

compuestos de selenio, excepto el sulfoseleniuro de cadmio ; rojo de cadmio

Clasificación,

T ; R 23/25	R 33

Etiquetado,

T

R : 23/25-33

S : (1/2-)20/21-28-45

Límites de concentración,

Cas No 7726-95-6	EEC No 231-778-1	No 035-001-00-5

Br_2

bromo

Clasificación,

T+ ; R 26	C ; R 35

Etiquetado,

T+ C

R : 26-35

S : (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

Cas No 10035-10-6	EEC No 233-113-0	No 035-002-00-0

HBr

bromuro de hidrógeno

Clasificación,

C; R 35	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 35-37

S: (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 035-002-01-8

NOTA B

HBr _ %

ácido bromhídrico _ %; bromuro de hidrógeno _ %

Clasificación,

C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado,

C

R: 34-37

S: (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

C ≥ 40 %	C; R 34-37
10 % ≤ C < 40 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 7758-01-2	EEC No 231-829-8	No 035-003-00-6

NOTA E

$KBrO_3$

bromato de potasio

Clasificación,

O; R 9	Carc. Cat. 2; R 45	T; R 25

Etiquetado,

T O

R: 45-9-25

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7440-67-7	EEC No 231-176-9	No 040-001-00-3

Zr

circonio en polvo (pirofórico)

Clasificación,

F; R 15-17

Etiquetado,

F

R: 15-17

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 040-002-00-9

Zr

circonio en polvo (estabilizado)

Clasificación,

F; R 15

Etiquetado,

R: 15

S: (2-)7/8-43

Límites de concentración,

Cas No 1313-27-5	EEC No 215-204-7	No 042-001-00-9

MoO_3

trióxido de molibdeno

Clasificación,

Xn; R 48/20/22 | Xi; R 36/37

Etiquetado,

Xn

R: 36/37-48/20/22

S: (2-)22-25

Límites de concentración,

Cas No 7761-88-8	EEC No 231-853-9	No 047-001-00-2

$AgNO_3$

nitrato de plata

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 048-001-00-5

NOTA A

compuestos de cadmio, excepto el sulfoseleniuro (xCdS.yCdSe), el sulfuro mixto de cadmio-cinc (xCdS.yZnS), el sulfuro mixto de cadmio y mercurio (xCdS.yHgS) y de los especialmente citados en este anexo

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R: 20/21/22

S: (2-)22*

* Si se considera oportuno.

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 0,1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 1306-19-0	EEC No 215-146-2	No 048-002-00-0

NOTA E

CdO

óxido de cadmio

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 49	T ; R 48/23/25	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 49-22-48/23/25

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 4464-23-7	EEC No 224-729-0	No 048-003-00-6

$Cd(HCOO)_2$

formiato de cadmio

Clasificación,

T ; R 23/25	R 33	Xn ; R 40

Etiquetado,

T

R : 23/25-33-40

S : (1/2-)22-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	T ; R 23/25-33-40
1 % ≤ C < 10 %	Xn ; R 20/22-33-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 20/22-33

Cas No 542-83-6	EEC No 208-829-1	No 048-004-00-1

$Cd(CN)_2$

cianuro de cadmio

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	R 32	R 33	Xn ; R 40

Etiquetado,

T+

R : 26/27/28-32-33-40

S : (1/2-)7-28-29-45

Límites de concentración,

C ≥ 7 %	T+ ; R 26/27/28-32-33-40
1 % ≤ C < 7 %	T ; R 23/24/25-32-33-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 20/21/22-33

Cas No 17010-21-8	EEC No 241-084-0	No 048-005-00-7

$CdSiF_6$

hexafluorosilicato de cadmio

Clasificación,

T ; R 23/25	R 33	Xn ; R 40

Etiquetado,

T

R : 23/25-33-40

S : (1/2-)22-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	T ; R 23/25-33-40
1 % ≤ C < 10 %	Xn ; R 20/22-33-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 20/22-33

Cas No 7790-79-6	EEC No 232-222-0	No 048-006-00-2

CdF_2

fluoruro de cadmio

Clasificación.

T; R 23/25	R 33	Xn; R 40

Etiquetado.

T

R: 23/25-33-40

S: (1/2-)22-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	T; R 23/25-33-40
1 % ≤ C < 10 %	Xn; R 20/22-33-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/22-33

Cas No 7790-80-9	EEC No 232-223-6	No 048-007-00-8

CdI_2

yoduro de cadmio

Clasificación.

T; R 23/25	R 33	Xn; R 40

Etiquetado.

T

R: 23/25-33-40

S: (1/2-)22-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	T; R 23/25-33-40
1 % ≤ C < 10 %	Xn; R 20/22-33-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/22-33

Cas No 10108-64-2	EEC No 233-296-7	No 048-008-00-3

NOTA E

$CdCl_2$

cloruro de cadmio

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45	T; R 48/23/25

Etiquetado.

T

R: 45-48/23/25

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 10124-36-4	EEC No 233-331-6	No 048-009-00-9

NOTA E

$CdSO_4$

sulfato de cadmio

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 49	T; R 48/23/25	Xn; R 22

Etiquetado.

T

R: 49-22-48/23/25

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 1306-23-6	EEC No 215-147-8	No 048-010-00-4

CdS

sulfuro de cadmio

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	T ; R 48/23/25	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 22-40-48/23/25

S : (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 10 %	T ; R 22-40-48/23/25
1 % ≤ C < 10 %	Xn ; R 40-48/20/22
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 48/20/22

Cas No 7646-78-8	EEC No 231-588-9	No 050-001-00-5

$SnCl_4$

tetracloruro de estaño

Clasificación,

C ; R 34	Xi ; R 37

Etiquetado,

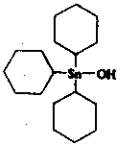
C

R : 34-37

S : (1/2-)7/8-26-45

Límites de concentración,

Cas No 13121-70-5	EEC No 236-049-1	No 050-002-00-0



cihexatin (ISO) ; hidróxido de tri(ciclohexil)estaño

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

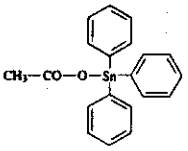
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 900-95-8	EEC No 212-984-0	No 050-003-00-6



acetato de fentin (ISO) ; acetato de trifenilestaño

Clasificación,

T+ ; R 26	T ; R 24/25	Xi ; R 36/38	R 43	N ; R 50-53

Etiquetado,

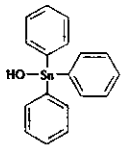
T+ N

R : 24/25-26-36/38-43-50/53

S : (1/2-)36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 76-87-9	EEC No 200-990-6	No 050-004-00-1



hidróxido de fentin (ISO); hidróxido de trifenilestaño

Clasificación.

T+; R 26	T; R 24/25	Xi; R 36/38	N; R 50-53

Etiquetado.

T+ N

R: 24/25-26-36/38-50/53

S: (1/2-)36/37-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No —	EEC No —	No 050-005-00-7

NOTA A

compuestos de trimetilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación.

T+; R 26/27/28

Etiquetado.

T+

R: 26/27/28

S: (1/2-)26-27-28-45

Límites de concentración.

NOTA 1

C ≥ 0,5 %	T+; R 26/27/28
0,1 % ≤ C < 0,5 %	T; R 23/24/25
0,05 % ≤ C < 0,1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 050-006-00-2

NOTA A

compuestos de trietilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación.

T+; R 26/27/28.

Etiquetado.

T+

R: 26/27/28

S: (1/2-)26-27-28-45

Límites de concentración.

NOTA 1

C ≥ 0,5 %	T+; R 26/27/28
0,1 % ≤ C < 0,5 %	T; R 23/24/25
0,05 % ≤ C < 0,1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —.	EEC No —	No 050-007-00-8

NOTA A

compuestos de tripropilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)26-27-28-45

Límites de concentración.

NOTA 1

C ≥ 0,5 %	T; R 23/24/25
0,1 % ≤ C < 0,5 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 050-008-00-3

NOTA A

compuestos de tributilestaño

Clasificación,

T; R 25-48/23/25	Xn; R 21	Xi; R 36/38

Etiquetado,

T

R: 21-25-36/38-48/23/25

S: (1/2-)35-36/37/39-45

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 1 %	T; R 21-25-36/38-48/23/25
0,25 % ≤ C < 1 %	Xn; R 22-48/20/22

Cas No —	EEC No —	No 050-009-00-9

NOTA A

compuestos de tripentilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R: 20/21/22

S: (2-)26-28

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 050-010-00-4

NOTA A

compuestos de trihexilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R: 20/21/22

S: (2-)26-28

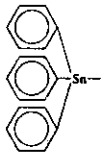
Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 050-011-00-X

NOTA A



compuestos de trifenilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)26-27-28-45

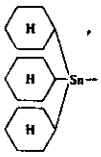
Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 1 %	T; R 23/24/25
0,25 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 050-012-00-5

NOTA A



compuestos de triciclohexilestaño, excepto aquellos especificamente expresados en este Anexo

Clasificación.

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

Xn

R : 20/21/22

S : (2-)26-28

Límites de concentración.

NOTA 1

C ≥ 1 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 050-013-00-0

NOTA A

compuestos de trioctilestaño, excepto aquellos especificamente expresados en este Anexo

Clasificación.

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

R : 36/37/38

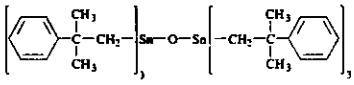
S : (2)

Límites de concentración.

NOTA 1

C ≥ 1 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 13356-08-6	EEC No 236-407-7	No 050-017-00-2



óxido de bis(tris(2-fenil-2-metilpropil)estaño) ; óxido de fenbutatina

Clasificación.

Xn ; R 21	Xi ; R 36/38

Etiquetado.

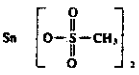
Xn

R : 21-36/38

S : (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 53408-94-9	EEC No 401-640-7	No 050-018-00-8



metansulfonato de estaño(II)

Clasificación.

C ; R 34	Xn ; R 22	R 43

Etiquetado.

C

R : 22-34-43

S : (1/2-)22-26-36/37/39-45

Límites de concentración.

Cas No 10025-91-9	EEC No 233-047-2	No 051-001-00-8

$SbCl_3$

tricloruro de antimonio

Clasificación.

C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado.

C

R: 34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración.

Cas No 7647-18-9	EEC No 231-601-8	No 051-002-00-3

$SbCl_5$

pentacloruro de antimonio

Clasificación.

C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado.

C

R: 34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración.

Cas No —	EEC No —	No 051-003-00-9

NOTA A

compuestos de antimonio, excepto el tetróxido (Sb_2O_4), el pentóxido (Sb_2O_5), el trisulfuro (Sb_2S_3), el pentasulfuro (Sb_2S_5) y los especialmente expresados en este anexo

Clasificación.

Xn; R 20/22

Etiquetado.

Xn

R: 20/22

S: (2-)22*

* Si se considera oportuno.

Límites de concentración.

NOTA 1

C ≥ 0,25 %	Xn; R 20/22

Cas No 7783-56-4	EEC No 232-009-2	No 051-004-00-4

SbF_3

trifluoruro de antimonio

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)7-26-45

Límites de concentración.

Cas No 1309-64-4 | EEC No 215-175-0 | No 051-005-00-X

Sb_2O_3

trióxido de diantimonio

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

Xn

R : 40

S : (2-)22-36

Límites de concentración,

Cas No 7553-56-2 | EEC No 231-442-4 | No 053-001-00-3

yodo

Clasificación,

Xn ; R 20/21

Etiquetado,

Xn

R : 20/21

S : (2-)23-25

Límites de concentración,

Cas No 10034-85-2 | EEC No 233-109-9 | No 053-002-00-9

HI

ácido yodhídrico anhidro ; yoduro de hidrógeno anhidro

Clasificación,

C ; R 35 | Xi ; R 37

Etiquetado,

C

R : 35-37

S : (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 053-002-01-6

NOTA B

HI .. %

ácido yodhídrico .. % ; yoduro de hidrógeno .. %

Clasificación,

C ; R 34

Etiquetado,

C

R : 34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38

Cas No 696-33-3	EEC No —	No 053-003-00-4

yodoxibenceno; yodilbenceno

Clasificación,

E; R 1

Etiquetado,

E

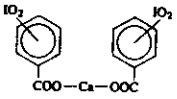
R: 1

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 053-004-00-X

NOTA C



yodoxibenzoato de calcio; yodilbenzoato de calcio

Clasificación,

E; R 1

Etiquetado,

E

R: 1

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No 1304-29-6	EEC No 215-128-4	No 056-001-00-1

BaO_2

peróxido de bario; dióxido de bario

Clasificación,

O; R 8	Xn; R 20/22

Etiquetado,

O Xn

R: 8-20/22

S: (2-)13-27

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 056-002-00-7

NOTA A

sales de bario, excepto el sulfato de bario ($BaSO_4$) y aquellas específicamente expresadas en este anexo

Clasificación,

Xn; R 20/22

Etiquetado,

Xn

R: 20/22

S: (2-)28

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 1 %	Xn; R 20/22

Cas No 513-77-9	EEC No 208-167-3	No 056-003-00-2

$BaCO_3$

carbonato de bario

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No 20816-12-0	EEC No 244-058-7	No 076-001-00-5

OsO_4

tetróxido de osmio

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28 | C ; R 34

Etiquetado,

T+

R : 26/27/28-34

S : (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración,

Cas No 7439-97-6	EEC No 231-106-7	No 080-001-00-0

Hg

mercurio

Clasificación,

T ; R 23 | R 33

Etiquetado,

T

R : 23-33

S : (1/2-)7-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 080-002-00-6

NOTA A

compuestos inorgánicos de mercurio, excepto el sulfuro mercúrico (cinabrio) y los específicamente expresados en este Anexo

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28 | R 33

Etiquetado,

T+

R : 26/27/28-33

S : (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 2 %	T+ ; R 26/27/28-33
0,5 % ≤ C < 2 %	T ; R 23/24/25-33
0,1 % ≤ C < 0,5 %	Xn ; R 20/21/22-33

Cas No 10112-91-1	EEC No 233-307-5	No 080-003-00-1

Hg_2Cl_2

dicloruro de dimercurio; calomelanos

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

Xn

R: 22-36/37/38

S: (2-)13-24/25-46

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 080-004-00-7

NOTA A

compuestos orgánicos de mercurio, excepto los específicamente expresados en este Anexo

Clasificación,

T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado,

T+

R: 26/27/28-33

S: (1/2-)13-28-36-45

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 1 %	T+; R 26/27/28-33
0,5 % ≤ C < 1 %	T; R 23/24/25-33
0,05 % ≤ C < 0,5 %	Xn; R 20/21/22-33

Cas No 628-86-4	EEC No 211-057-8	No 080-005-00-2

isocianato de mercurio; fulminato de mercurio

Clasificación,

E; R 3	T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

E T

R: 3-23/24/25-33

S: (1/2-)3-34-35-45

Límites de concentración,

Cas No 1335-31-5	EEC No 215-629-8	No 080-006-00-8

$Hg(CN)_2HgO$

oxicianuro de mercurio

Clasificación,

E; R 3	T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

E T

R: 3-23/24/25-33

S: (1/2-)28-35-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 080-007-00-3

NOTA A

$Hg(C_nH_{2n+1})_2$

derivados de alquilmercurio

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado,

T+

R : 26/27/28-33

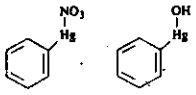
S : (1/2-)13-28-36-45

Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 0,5 %	T+ ; R 26/27/28-33
0,1 % ≤ C < 0,5 %	T ; R 23/24/25-33
0,05 % ≤ C < 0,1 %	Xn ; R 20/21/22-33

Cas No 8003-05-2	EEC No —	No 080-008-00-9



hidróxido de fenilmercurio–nitrato de fenilmercurio

Clasificación,

T ; R 25-48/24/25	C ; R 34	Xi ; R 37	R 44

Etiquetado,

T

R : 25-34-37-44-48/24/25

S : (1/2-)23-24/25-37-45

Límites de concentración,

Cas No 123-88-6	EEC No 204-659-7	No 080-009-00-4

$CH_3 — O — CH_2 — CH_2 — Hg — Cl$

cloruro de 2-metoxietilmercurio

Clasificación,

T ; R 25-48/25	C ; R 34

Etiquetado,

T

R : 25-34-48/25

S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 7487-94-7	EEC No 231-299-8	No 080-010-00-X

$HgCl_2$

dicloruro de mercurio

Clasificación,

T+ ; R 28	C ; R 34	T ; R 48/24/25

Etiquetado,

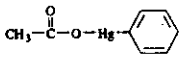
T+

R : 28-34-48/24/25

S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 62-38-4	EEC No 200-532-5	No 080-011-00-5



acetato de fenilmercurio

Clasificación,

T; R 25-48/24/25	C; R 34

Etiquetado,

T

R: 25-34-48/24/25

S: (1/2-)23-24/25-37-45

Límites de concentración,

Cas No 7440-28-0	EEC No 231-138-1	No 081-001-00-3

Tl

talio

Clasificación,

T+; R 26/28	R 33

Etiquetado,

T+

R: 26/28-33

S: (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 081-002-00-9

NOTA A

compuestos de talio, excepto los especialmente expresados en este anexo

Clasificación,

T+; R 26/28	R 33

Etiquetado,

T+

R: 26/28-33

S: (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No 7446-18-6	EEC No 231-201-3	No 081-003-00-4

Tl_2SO_4

sulfato de ditalio

Clasificación,

T+; R 28	Xi; R 38	T; R 48/25

Etiquetado,

T+

R: 28-38-48/25

S: (1/2-)13-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 082-001-00-6

NOTA A
NOTA E

compuestos de plomo, excepto de los especialmente expresados en este Anexo

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 61	Xn ; R 20/22	R 33

Etiquetado,

T

R : 61-20/22-33
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 082-002-00-1

NOTA A
NOTA E

$Pb(C_nH_{2n+1})_4$ $n = 1 - 5$

derivados de alquilplomo

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 61	T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado,

T+

R : 61-26/27/28-33
S : 53-45

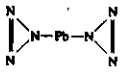
Límites de concentración,

NOTA 1

C ≥ 0,5 %	T+ ; R 61-26/27/28-33
0,1 % ≤ C < 0,5 %	T ; R 61-23/24/25-33
0,05 % ≤ C < 0,1 %	Xn ; R 20/21/22-33

Cas No 13424-46-9	EEC No 236-542-1	No 082-003-00-7

NOTA E



nitruro de plomo ; azida de plomo II

Clasificación,

E ; R 3	Repr. Cat. 1 ; R 61	Xn ; R 20/22	R 33

Etiquetado,

E

T

R : 61-3-20/22-33
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7758-97-6	EEC No 231-846-0	No 082-004-00-2

$PbCrO_4$

cromato de plomo

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 61	Carc. Cat. 3 ; R 40	R 33

Etiquetado,

T

R : 61-33-40
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 301-04-2	EEC No 206-104-4	No 082-005-00-8

NOTA E

$C_4H_6O_4Pb$

di(acetato) de plomo

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 60-61	Xn ; R 48/22	R 33

Etiquetado,

T

R : 60-61-33-48/22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 7446-27-7	EEC No 231-205-5	No 082-006-00-3

NOTA E

$Pb_3P_2O_8$

bis(ortofosfato) de triplomo

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 60-61	Xn ; R 48/22	R 33

Etiquetado,

T

R : 60-61-33-48/22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 1335-32-6	EEC No 215-630-3	No 082-007-00-9

NOTA E

$Pb(CH_3CoO)_2 \cdot 2Pb(OH)_2$

acetato de plomo ; básico

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 60-61	Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 48/22	R 33

Etiquetado,

T

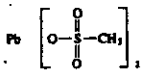
R : 60-61-33-40-48/22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 17570-76-2	EEC No 401-750-5	No 082-008-00-4

NOTA E



metansulfonato de plomo(II)

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 60-61	Xn ; R 20/22-48/20/22	Xi ; R 38-41	R 33	N ; R 58

Etiquetado,

T N

R : 60-61-20/22-33-38-41-48/20/22-58

S : 53-45-57-61

Límites de concentración,

Cas No 7440-61-1	EEC No 231-170-6	No 092-001-00-8

U

uranio

Clasificación,

T+ ; R 26/28	R 33

Etiquetado,

T+

R : 26/28-33

S : (1/2-)20/21-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 092-002-00-3

NOTA A

compuestos de uranio

Clasificación,

T+ ; R 26/28	R 33

Etiquetado,

T+

R : 26/28-33

S : (1/2-)20/21-45

Límites de concentración,

Cas No 74-82-8	EEC No 200-812-7	No 601-001-00-4

CH_4

metano

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 74-84-0	EEC No 200-814-8	No 601-002-00-X

$CH_3 — CH_3$

etano

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 74-98-6 | EEC No 200-827-9 | No 601-003-00-5

$CH_3 — CH_2 — CH_3$

propano

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 106-97-8 | EEC No 203-448-7 | No 601-004-00-0

NOTA C

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_3$

butano

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 463-82-1 | EEC No 207-343-7 | No 601-005-00-6

dimetilpropano

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

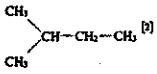
Cas No 109-66-0 [1]
78-78-4 [2]

EEC No 203-692-4 [1]
201-142-8 [2]

No 601-006-00-1

NOTA C

$CH_3—CH_2—CH_2—CH_2—CH_3$ [1]



pentano [1] e isopentano ; metilbutano [2]

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

F

R : 11

S : (2-)9-16-29-33

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 601-007-00-7

NOTA C

C_6H_{14}

hexano; mezcla de isómeros (conteniendo menor de un 5 % de n-hexano EEC No 203-777-6)

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16-23-29-33

Límites de concentración,

Cas No 142-82-5

EEC No 205-563-8

No 601-008-00-2

NOTA C

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_3$

heptano

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16-23-29-33

Límites de concentración,

Cas No 111-65-9

EEC No 203-892-1

No 601-009-00-8

NOTA C

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_3$

octano

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16-29-33

Límites de concentración,

Cas No 74-85-1

EEC No 200-815-3

No 601-010-00-3

$CH_2 = CH_2$

eteno; etileno

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,

F+

R: 12

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 115-07-1	EEC No 204-062-1	No 601-011-00-9

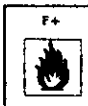
$CH_2 = CH - CH_3$

propeno; propileno

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,



R: 12

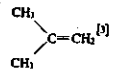
S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 106-98-9 [1] 107-01-7 [2] 115-11-7 [3]	EEC No 203-449-2 [1] 203-452-9 [2] 204-066-3 [3]	No 601-012-00-4

NOTA C

$CH_3-CH_2-CH=CH_2$ [1] $CH_3-CH=CH-CH_3$ [2]

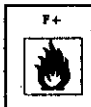


1,buteno; butileno [1], 2,buteno; butileno [2], 2-metilpropeno; isobutileno [3]

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,



R: 12

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 106-99-0	EEC No 203-450-8	No 601-013-00-X

NOTA D

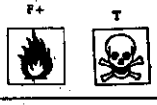
$CH_2 = CH - CH = CH_2$

1,3-butadieno

Clasificación,

F+; R 12	Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado,



R: 45-12

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 78-79-5	EEC No 201-143-3	No 601-014-00-5

NOTA D

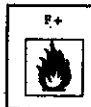
$CH_2=CH-C(CH_3)=CH_2$

2-metil-1,3-butadieno; isopreno

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,



R: 12

S: (2-)9-16-29-33

Límites de concentración,

Cas No 74-86-2 | EEC No 200-816-9 | No 601-015-00-0

HC≡CH

etino ; acetileno

Clasificación,

R 5	R 6	F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 5-6-12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 75-19-4 | EEC No 200-847-8 | No 601-016-00-6

ciclopropano

Clasificación,

F+ ; R 12

Etiquetado,

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 110-82-7 | EEC No 203-806-2 | No 601-017-00-1

ciclohexano

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

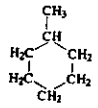
F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 108-87-2 | EEC No 203-624-3 | No 601-018-00-7



metilciclohexano

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

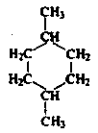
F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 589-90-2	EEC No 209-663-2	No 601-019-00-2



1,4-dimetilciclohexano

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 71-43-2	EEC No 200-753-7	No 601-020-00-8

NOTA E

benceno

Clasificación,

F; R 11	Carc. Cat. 1; R 45	T; R 48/23/24/25

Etiquetado,

F T

R: 45-11-48/23/24/25

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 108-88-3	EEC No 203-625-9	No 601-021-00-3

tolueno

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20

Etiquetado,

F Xn

R: 11-20

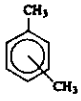
S: (2-)16-25-29-33

Límites de concentración,

C ≥ 12,5 %	Xn; R 20

Cas No 1330-20-7 (mix)	EEC No 215-535-7 (mix)	No 601-022-00-9
95-47-6 (o)	202-422-2 (o)	
108-38-3 (m)	203-576-3 (m)	
106-42-3 (p)	203-396-5 (p)	

NOTA C



xileno

Clasificación,

R 10	Xn; R 20/21	Xi; R 38

Etiquetado,

Xn

R: 10-20/21-38

S: (2-)25

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn; R 20/21-38
12,5 % ≤ C < 20 %	Xn; R 20/21

Cas No 100-41-4	EEC No 202-849-4	No 601-023-00-4

etilbenceno

Clasificación.

F ; R 11	Xn ; R 20

Etiquetado.

F Xn

R : 11-20

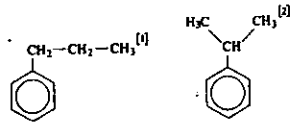
S : (2-)16-24/25-29

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 20

Cas No 103-65-1 [1] 98-82-8 [2]	EEC No 203-132-9 [1] 202-704-5 [2]	No 601-024-00-X

NOTA C



propilbenceno [1] e isopropilbenceno ; cumeno [2]

Clasificación.

R 10	Xi ; R 37

Etiquetado.

Xi

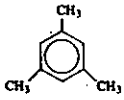
R : 10-37

S : (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xi ; R 37

Cas No 108-67-8	EEC No 203-604-4	No 601-025-00-5



1,3,5-trimetilbenceno ; mesitileno

Clasificación.

R 10	Xi ; R 37

Etiquetado.

Xi

R : 10-37

S : (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xi ; R 37

Cas No 100-42-5	EEC No 202-851-5	No 601-026-00-0

NOTA D

estireno

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20	Xi ; R 36/38

Etiquetado.

Xn

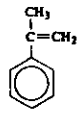
R : 10-20-36/38

S : (2-[illegible])

Límites de concentración.

C ≥ 12,5 %	Xn ; R 20-36/38

Cas No 98-83-9 | EEC No 202-705-0 | No 601-027-00-6



isopropenilbenceno ; α-metilestireno

Clasificación.

R 10	Xi ; R 36/37

Etiquetado.

Xi

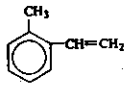
R : 10-36/37

S : (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xi ; R 36/37

Cas No 611-15-4 | EEC No 210-256-7 | No 601-028-00-1



2-viniltolueno ; o-metilestireno

Clasificación.

Xn ; R 20

Etiquetado.

Xn

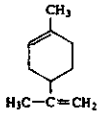
R : 20

S : (2-)24

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 20

Cas No 138-86-3 | EEC No 205-341-0 | No 601-029-00-7



1,8(9)-p-mentadieno ; dipenteno

Clasificación.

R 10	Xi ; R 38

Etiquetado.

Xi

R : 10-38

S : (2-)28

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xi ; R 38

Cas No 287-92-3 | EEC No 206-016-6 | No 601-030-00-2

ciclopentano

Clasificación.

F ; R 11

Etiquetado.

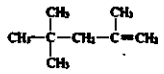
F

R : 11

S : (2-)9-16-29-33

Límites de concentración.

Cas No 107-39-1 | EEC No 203-486-4 | No 601-031-00-8



2,4,4-trimetil-1-penteno ; diisobutileno

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

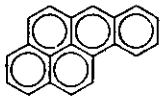
F

R : 11

S : (2-)9-16-29-33

Límites de concentración,

Cas No 50-32-8 | EEC No 200-028-5 | No 601-032-00-3



benzo[a]pireno ; benzo[d,e,f]criseno

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Muta. Cat. 2 ; R 46	Repr. Cat. 2 ; R 60-61

Etiquetado,

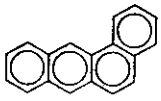
T

R : 45-46-60-61

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 56-55-3 | EEC No 200-280-6 | No 601-033-00-9



benzo[a]antraceno

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado,

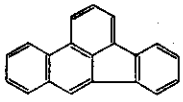
T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 205-99-2 | EEC No 205-911-9 | No 601-034-00-4



benzo[b]fluoranteno ; benzo[e]acefenantrileno

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado,

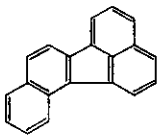
T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 205-82-3 | EEC No 205-910-3 | No 601-035-00-X



benzo[j]fluoranteno

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

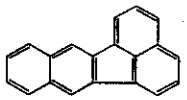
T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 207-08-9 | EEC No 205-916-6 | No 601-036-00-5



benzo[k]fluoranteno

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 110-54-3 | EEC No 203-777-6 | No 601-037-00-0

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_3$$

n-hexano

Clasificación.

F; R 11	Xn; R 48/20

Etiquetado.

F Xn

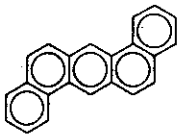
R: 11-48/20

S: (2-)9-16-24/25-29-51

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xn; R 48/20

Cas No 53-70-3 | EEC No 200-181-8 | No 601-041-00-2



dibenzo[a,h]antraceno

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

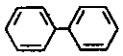
T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 92-52-4 | EEC No 202-163-5 | No 601-042-00-8



bifenilo ; difenilo

Clasificación,

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R : 36/37/38

S : (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 95-63-6 | EEC No 202-436-9 | No 601-043-00-3

C_9H_{12}

1,2,4-trimetilbenceno

Clasificación,

R 10 | Xn ; R 20 | Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xn

R : 10-20-36/37/38

S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 77-73-6 | EEC No 201-052-9 | No 601-044-00-9

$C_{10}H_{12}$

3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno

Clasificación,

F ; R 11 | Xn ; R 20/22 | Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

F Xn

R : 11-20/22-36/37/38

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 119-64-2 | EEC No 204-340-2 | No 601-045-00-4

1,2,3,4-tetrahidronaftaleno

Clasificación,

Xi ; R 36/38 | R 19

Etiquetado,

Xi

R : 19-36/38

S : (2-)26-28

Límites de concentración,

Cas No 74-87-3 | EEC No 200-817-4 | No 602-001-00-7

clorometano; cloruro de metilo

Clasificación,

F+; R 12 | Carc. Cat. 3; R 40 | Xn; R 48/20

Etiquetado,

F+ Xn

R: 12-40-48/20

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 74-83-9 | EEC No 200-813-2 | No 602-002-00-2

CH_3Br

bromometano; bromuro de metilo

Clasificación,

T; R 23 | Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

T

R: 23-36/37/38

S: (1/2-)15-27-36/37/39-38-45

Límites de concentración,

Cas No 74-95-3 | EEC No 200-824-2 | No 602-003-00-8

CH_2Br_2

dibromometano; bromuro de metileno

Clasificación,

Xn; R 20

Etiquetado,

Xn

R: 20

S: (2-)24

Límites de concentración,

C ≥ 12,5 %	Xn; R 20

Cas No 75-09-2 | EEC No 200-838-9 | No 602-004-00-3

CH_2Cl_2

diclorometano; cloruro de metileno

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

Xn

R: 40

S: (2-)23-24/25-36/37

Límites de concentración,

Cas No 74-88-4	EEC No 200-819-5	No 602-005-00-9

CH_3I

ioduro de metilo ; yodometano

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 21	T ; R 23/25	Xi ; R 37/38

Etiquetado,

T

R : 21-23/25-37/38-40

S : (1/2-)36/37-38-45

Límites de concentración,

Cas No 67-66-3	EEC No 200-663-8	No 602-006-00-4

triclorometano ; cloroformo

Clasificación,

Xn ; R 22-48/20/22	Xi ; R 38	Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

Xn

R : 22-38-40-48/20/22

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn ; R 22-38-40-48/20/22
5 % ≤ C < 20 %	Xn ; R 22-40-48/20/22
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 40

Cas No 75-25-2	EEC No 200-854-6	No 602-007-00-X

$CHBr_3$

tribromometano ; bromoformo

Clasificación,

T ; R 23	Xi ; R 36/38

Etiquetado,

T+

R : 23-36/38

S : (1/2-)28-45

Límites de concentración,

Cas No 56-23-5	EEC No 200-262-8	No 602-008-00-5

CCl_4

tetraclorometano ; tetracloruro de carbono

Clasificación,

T ; R 23/24/25-48/23	Carc. Cat. 3 ; R 40	N ; R 59

Etiquetado,

T N

R : 23/24/25-40-48/23-59

S : (1/2-)23-36/37-45-59-61

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	T ; R 23/24/25-40-48/23
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 20/21/22-48/20

Cas No 75-00-3	EEC No 200-830-5	No 602-009-00-0

C_2H_5Cl

cloroetano; cloruro de etilo

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,

F+

R: 12

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 106-93-4	EEC No 203-444-3	No 602-010-00-6

NOTA E

$BrCH_2 — CH_2Br$

1,2-dibromoetano; dibromuro de etileno

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T; R 23/24/25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

T

R: 45-23/24/25-36/37/38

S: 53-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T; R 45-23/24/25-36/37/38
1 % ≤ C < 20 %	T; R 45-23/24/25
0,1 % ≤ C < 1 %	T; R 45-20/21/22

Cas No 75-34-3	EEC No 200-863-5	No 602-011-00-1

$CH_3 — CHCl_2$

1,1-dicloroetano; dicloruro de etilideno

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 22	Xi; R 36/37

Etiquetado,

F Xn

R: 11-22-36/37

S: (2-)16-23

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn; R 22-36/37
12,5 % ≤ C < 20 %	Xn; R 22

Cas No 107-06-2	EEC No 203-458-1	No 602-012-00-7

NOTA E

$CH_2Cl — CH_2Cl$

1,2-dicloroetano; cloruro de etileno

Clasificación,

F; R 11	Carc. Cat. 2; R 45	Xn; R 22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

F T

R: 45-11-22-36/37/38

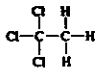
S: 53-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	T; R 45-22-36/37/38
20 % ≤ C < 25 %	T; R 45-36/37/38
0,1 % ≤ C < 20 %	T; R 45

Cas No 71-55-6	EEC No 200-756-3	No 602-013-00-2

NOTA F

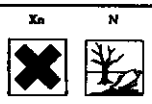


1,1,1-tricloroetano; metilcloroformo

Clasificación,

Xn; R 20	N; R 59

Etiquetado,



R: 20-59

S: (2-)24/25-59-61

Límites de concentración,

Cas No 79-00-5	EEC Nu 201-166-9	No 602-014-00-8

$CHCl_2 — CH_2Cl$

1,1,2-tricloroetano

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

R: 20/21/22

S: (2-)9

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 79-34-5	EEC No 201-197-8	No 602-015-00-3

$CHCl_2 — CHCl_2$

1,1,2,2-tetracloroetano; tetracloruro de acetileno

Clasificación,

T+; R 26/27

Etiquetado,

R: 26/27

S: (1/2-)38-45

Límites de concentración,

C ≥ 7 %	T+; R 26/27
1 % ≤ C < 7 %	T; R 23/24
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21

Cas No 79-27-6	EEC No 201-191-5	No 602-016-00-9

$CHBr_2 — CHBr_2$

1,1,2,2-tetrabromoetano; tetrabromuro de acetileno

Clasificación,

T+; R 26	Xi; R 36

Etiquetado,

R: 26-36

S: (1/2-)24-27-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T+; R 26-36
7 % ≤ C < 20 %	T+; R 26
1 % ≤ C < 7 %	T; R 23
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20

Cas No 76-01-7	EEC No 200-925-1	No 602-017-00-4

pentacloroetano

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	T ; R 48/23

Etiquetado,

T

R : 40-48/23

S : (1/2-)23-36/37-45

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	T ; R 40-48/23
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 48/20

Cas No 26446-76-4	EEC No —	No 602-018-00-X

NOTA C

C_3H_7Cl

cloropropano ; cloruro de propilo

Clasificación,

F ; R 11	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

F Xn

R : 11-20/21/22

S : (2-)9-29

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 106-94-5	EEC No 203-445-0	No 602-019-00-5

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — Br$

1-bromopropano ; bromuro de propilo

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20

Etiquetado,

Xn

R : 10-20

S : (2-)9-24

Límites de concentración,

Cas No 78-87-5	EEC No 201-152-2	No 602-020-00-0

$CH_2Cl — CHCl — CH_3$

1,2-dicloropropano ; dicloruro de propileno

Clasificación,

F ; R 11	Xn ; R 20/22

Etiquetado,

F Xn

R : 11-20/22

S : (2-)16-24

Límites de concentración,

Cas No 96-12-8	EEC No 202-479-3	No 602-021-00-6

NOTA E

$CH_2Br — CHBr — CH_2Cl$

1,2-dibromo-3-cloropropano

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	Muta. Cat. 2; R 46	T; R 25	Xn; R 48/20/22

Etiquetado,

T

R: 45-46-25-48/20/22

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 29656-63-1	EEC No —	No 602-022-00-1

NOTA C

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_2 — CH_2Cl$

cloropentano; cloruro de amilo

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

F Xn

R: 11-20/21/22

S: (2-)9-29

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 75-01-4	EEC No 200-831-0	No 602-023-00-7

NOTA D

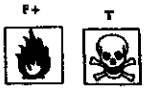
cloruro de vinilo; cloroetileno

Clasificación,

F+; R 12	Carc. Cat. 1; R 45

Etiquetado,

F+ T



R: 45-12

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 593-60-2	EEC No 209-800-6	No 602-024-00-2

$CH_2 = CHBr$

bromuro de vinilo; bromoetileno

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,

F+

R: 12

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 75-35-4	EEC No 200-864-0	No 602-025-00-8

NOTA D

$CH_2 = CCl_2$

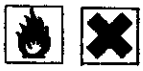
1,1-dicloroetileno; cloruro de vinilideno

Clasificación,

F+; R 12	Xn; R 20-40

Etiquetado,

F+ Xn



R: 12-20-40

S: (2-)7-16-29

Límites de concentración,

C ≥ 12,5 %	Xn; R 20-40
1 % ≤ C < 12,5 %	Xn; R 40

Cas No 540-59-0	EEC No 208-750-2	No 602-026-00-3

CHCl = CHCl

1,2-dicloroetileno; dicloruro de acetileno

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20

Etiquetado,

F Xn

R: 11-20

S: (2-)7-16-29

Límites de concentración,

C ≥ 12,5 %	Xn; R 20

Cas No 79-01-6	EEC No 201-167-4	No 602-027-00-9

tricloroetileno

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

Xn

R: 40

S: (2-)23-36/37

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xn; R 40

Cas No 127-18-4	EEC No 204-825-9	No 602-028-00-4

tetracloroetileno; percloroetileno

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

Xn

R: 40

S: (2-)23-36/37

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xn; R 40

Cas No 107-05-1	EEC No 203-457-6	No 602-029-00-X

NOTA D

$CH_2 = CH - CH_2Cl$

3-cloropropeno; cloruro de alilo

Clasificación.

F; R 11	T+; R 26

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 542-75-6	EEC No 208-826-5	No 602-030-00-5

NOTA D

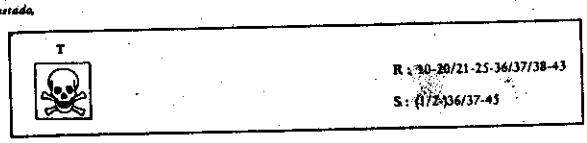
$ClCH = CH - CH_2Cl$

1,3-dicloropropeno

Clasificación.

R 10	T; R 25	Xn; R 20/21	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 563-58-6 [1] 563-54-2 [2]	EEC No 209-253-3 [1]	No 602-031-00-0

NOTA C

$CH_3 - CH = CCl_2$ [1]

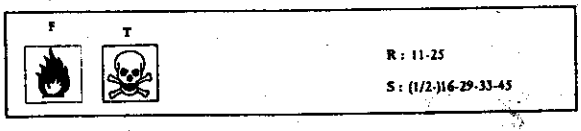
$CH_3 - CCl = CHCl$ [2]

1,1-dicloropropeno [1], 1,2-dicloropropeno [2]

Clasificación.

F; R 11	T; R 25

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 563-47-3	EEC No 209-251-2	No 602-032-00-6

$CH_2 = C(CH_3) - CH_2Cl$

3-cloro-2-metilpropeno; cloruro de metalilo

Clasificación.

F; R 11	Xn; R 20

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 108-90-7	EEC No 203-628-5	No 602-033-00-1

Clorobenceno

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20

Etiquetado,

Xn

R : 10-20

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xn ; R 20

Cas No 95-50-1	EEC No 202-425-9	No 602-034-00-7

1,2-diclorobenceno ; o-diclorobenceno

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xn

R : 22-36/37/38

S : (2-)23

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn ; R 22-36/37/38
5 % ≤ C < 20 %	Xn ; R 22

Cas No 106-46-7	EEC No 203-400-5	No 602-035-00-2

1,4-diclorobenceno ; p-diclorobenceno

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/38

Etiquetado,

Xn

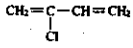
R : 22-36/38

S : (2-)22-24/25-46

Límites de concentración,

Cas No 126-99-8	EEC No 204-818-0	No 602-036-00-8

NOTA D



2-cloro-1,3-butadieno ; cloropreno

Clasificación,

F ; R 11	Xn ; R 20/22	Xi ; R 36

Etiquetado,

F Xn

R : 11-20/22-36

S : (2-)16

Límites de concentración,

Cas No 100-44-7	EEC No 202-853-6	No 602-037-00-3

α-clorotolueno ; cloruro de bencilo

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	T ; R 23	Xn ; R 22	Xi ; R 37/38-41

Etiquetado.

T

R : 22-23-37/38-40-41

S : (1/2-)36/37-38-45

Límites de concentración.

Cas No 98-07-7	EEC No 202-634-5	No 602-038-00-9

NOTA E

α,α,α-triclorotolueno ; triclorometilbenceno

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	T ; R 23	Xn ; R 22	Xi ; R 37/38-41

Etiquetado.

T

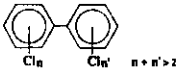
R : 45-22-23-37/38-41

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 1336-36-3	EEC No 215-648-1	No 602-039-00-4

NOTA C



bifenilos policlorados ; PCB

Clasificación.

R 33	N ; R 50-53

Etiquetado.

Xn N

R : 33-50/53

S : (2-)35-60-61

Límites de concentración.

C ≥ 0.005 %	Xn ; R 33

Cas No 108-41-8 (m) 95-49-8 (o) 106-43-4 (p) 25168-05-2 (mix)	EEC No 203-580-5 (m) 202-424-3 (o) 203-397-0 (p) 246-698-2 (mix)	No 602-040-00-X

NOTA C

clorotolueno

Clasificación.

Xn ; R 20

Etiquetado.

Xn

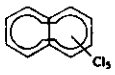
R : 20

S : (2-)24/25

Límites de concentración.

Cas No 1321-64-8 | EEC No 215-320-8 | No 602-041-00-5

NOTA C



pentacloronaftaleno

Clasificación.

Xn ; R 21/22	Xi ; R 36/38

Etiquetado.

Xn

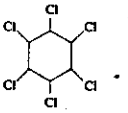
R : 21/22-36/38

S : (2-)35

Límites de concentración.

Cas No 608-73-1 | EEC No 210-168-9 | No 602-042-00-0

NOTA C



HCH (ISO) ; BHC (ISO) ; 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano

Clasificación.

T ; R 25	Xn ; R 21	Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado.

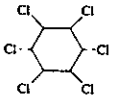
T

R : 21-25-40

S : (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 58-89-9 | EEC No 200-401-2 | No 602-043-00-6



γ-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano ; lindano

Clasificación.

T ; R 23/24/25	Xi ; R 36/38	N ; R 50-53

Etiquetado.

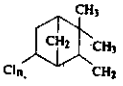
T N

R : 23/24/25-36/38-50/53

S : (1/2-)13-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 8001-35-2 | EEC No 232-283-3 | No 602-044-00-1



67-69 % Cl

canfecloro (ISO)

Clasificación.

T ; R 25	Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 21	Xi ; R 37/38

Etiquetado.

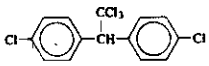
T

R : 21-25-37/38-40

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 50-29-3	EEC No 200-024-3	No 602-045-00-7



DDT (nombre común, no adoptado por ISO); clofenotano (DCI); dicofano; 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano; diclorodifeniltricloroetano

Clasificación,

T; R 25-48/25	Carc. Cat. 3; R 40	N; R 50-53

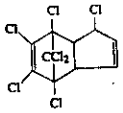
Etiquetado,

R: 25-40-48/25-50/53

S: (1/2-)22-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 76-44-8	EEC No 200-962-3	No 602-046-00-2



heptacloro (ISO); 1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano

Clasificación,

T; R 24/25	Carc. Cat. 3; R 40	R 33	N; R 50-53

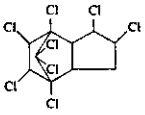
Etiquetado,

R: 24/25-33-40-50/53

S: (1/2-)36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 57-74-9	EEC No 200-349-0	No 602-047-00-8

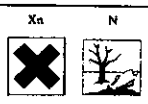


clordano (ISO)

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40	Xn; R 21/22	N; R 50-53

Etiquetado,

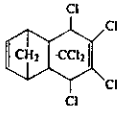


R: 21/22-40-50/53

S: (2-)36/37-60-61

Límites de concentración,

Cas No 309-00-2	EEC No 206-215-8	No 602-048-00-3



aldrin (ISO)

Clasificación,

T; R 24/25-48/24/25	Carc. Cat. 3; R 40	N; R 50-53

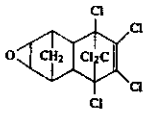
Etiquetado,

R: 24/25-40-48/24/25-50/53

S: (1/2-)22-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 60-57-1 | EEC No 200-484-5 | No 602-049-00-9

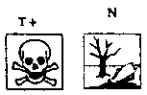


dieldrina (ISO)

Clasificación.

T+ ; R 27	T ; R 25-48/25	Carc. Cat. 3 ; R 40	N ; R 50-53

Etiquetado.

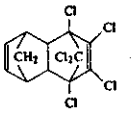


R : 25-27-40-48/25-50/53

S : (1/2-)22-36/37-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 465-73-6 | EEC No 207-366-2 | No 602-050-00-4



isodrin ; 1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo-5,8-endo-dimetanonaftaleno

Clasificación.

T+ ; R 26/27/28

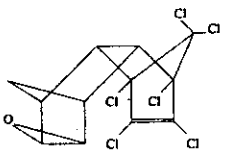
Etiquetado.

R : 26/27/28

S : (1/2-)13-28-45

Límites de concentración.

Cas No 72-20-8 | EEC No 200-775-7 | No 602-051-00-X



endrin (ISO) ; 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4 :5,8-dimetanonaftaleno

Clasificación.

T+ ; R 28	T ; R 24	N ; R 50-53

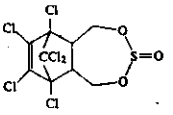
Etiquetado.

R : 24-28-50/53

S : (1/2-)22-36/37-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 115-29-7 | EEC No 204-079-4 | No 602-052-00-5



endosulfán (ISO) ; sulfito de 1,2,3,4,7,7-hexacloro-8,9,10-trinorborn-2-en-5,6-ilendimetilo

Clasificación.

T ; R 24/25	Xi ; R 36	N ; R 50-53

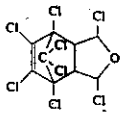
Etiquetado.

R : 24/25-36-50/53

S : (1/2-)28-36/37-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 297-78-9 | EEC No 206-045-4 | No 602-053-00-0



isobenzán (ISO); 1,3,4,5,6,7,8,8-octacloro-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoisobenzofurano

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

T+

R : 27/28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 556-56-9 | EEC No 209-130-4 | No 602-054-00-6

$CH_2 = CH - CH_2I$

3-yodopropeno; yoduro de alilo

Clasificación,

R 10	C; R 34

Etiquetado,

C

R : 10-34

S : (1/2-)7-26-45

Límites de concentración,

Cas No 74-96-4 | EEC No 200-825-8 | No 602-055-00-1

$CH_3 - CH_2Br$

bromoetano; bromuro de etilo

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 98-08-8 | EEC No 202-635-0 | No 602-056-00-7

α,α,α-trifluorotolueno; trifluorurometilbenceno

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

F

R : 11

S : (2-)16-23

Límites de concentración,

Cas No 100-39-0 | EEC No 202-847-3 | No 602-057-00-2

α-bromotolueno; bromuro de bencilo

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R: 36/37/38

S: (2-)39

Límites de concentración,

Cas No 98-87-3 | EEC No 202-709-2 | No 602-058-00-8

α,α-diclorotolueno; cloruro de bencilideno

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40	T; R 23	Xn; R 22	Xi; R 37/38-41

Etiquetado,

T

R: 22-23-37/38-40-41

S: (1/2-)36/37-38-45

Límites de concentración,

Cas No 109-69-3 | EEC No 203-696-6 | No 602-059-00-3

$CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_2Cl$

1-clorobutano; cloruro de butilo

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16-29

Límites de concentración,

Cas No 108-86-1 | EEC No 203-623-8 | No 602-060-00-9

bromobenceno

Clasificación,

R 10	Xi; R 38

Etiquetado,

Xi

R: 10-38

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 116-15-4 | EEC No 204-127-4 | No 602-061-00-4

$CF_3 — CF = CF_2$

hexafluoropropeno ; perfluoropropeno

Clasificación.

Xn ; R 20	Xi ; R 37

Etiquetado.

Xn

R : 20-37

S : (2-)41

Límites de concentración.

Cas No 96-18-4 | EEC No 202-486-1 | No 602-062-00-X

NOTA D

$Cl\ CH_2 — CHCl — CH_2\ Cl$

1,2,3-tricloropropano

Clasificación.

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

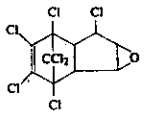
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)37/39

Límites de concentración.

Cas No 1024-57-3 | EEC No 213-831-0 | No 602-063-00-5



epóxido de heptacloro ; 2,3-epoxi-1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano

Clasificación.

T ; R 25	Carc. Cat. 3 ; R 40	R 33

Etiquetado.

T

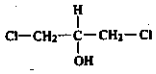
R : 25-33-40

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 96-23-1 | EEC No 202-491-9 | No 602-064-00-0

NOTA E



1,3-dicloro-2-propanol

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	T ; R 25	Xn ; R 21

Etiquetado.

T

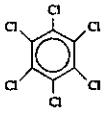
R : 45-21-25

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 118-74-1 | EEC No 204-273-9 | No 602-065-00-6

NOTA E



hexaclorobenceno

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45 | T; R 48/25

Etiquetado.

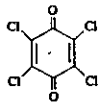
T

R: 45-48/25

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 118-75-2 | EEC No 204-274-4 | No 602-066-00-1



tetracloro-p-benzoquinona; cloranilo

Clasificación.

Xi; R 36/38

Etiquetado.

Xi

R: 36/38

S: (2-)37

Límites de concentración.

Cas No 541-73-1 | EEC No 208-792-1 | No 602-067-00-7

1,3-diclorobenceno

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

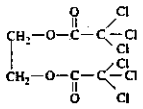
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 2514-53-6 | EEC No 219-732-9 | No 602-068-00-2



bis(tricloroacetato) de etileno

Clasificación.

Xi; R 38

Etiquetado.

Xi

R: 38

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 7572-29-4 | EEC No — | No 602-069-00-8

Cl—C≡C—Cl

dicloroacetileno

Clasificación,

E ; R 2	Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 48/20

Etiquetado,

E Xn

R : 2-40-48/20

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 77227-99-7 | EEC No 401-930-3 | No 602-070-00-3

3-cloro-4,5,alfa,alfa,alfa-pentafluorotolueno

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20/22	N ; R 50-58

Etiquetado,

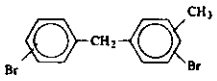
Xn N

R : 10-20/22-50-58

S : (2-)51-60-61

Límites de concentración,

Cas No 99688-47-8 | EEC No 402-210-1 | No 602-071-00-9



bromobencilbromotolueno, mezcla de isómeros

Clasificación,

Xn ; R 48/22	R 43	N ; R 50-53

Etiquetado,

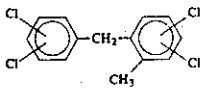
Xn N

R : 43-48/22-50/53

S : (2-)24-37-41-60-61

Límites de concentración,

Cas No 76253-60-6 | EEC No 278-404-3 | No 602-072-00-4



dicloro (diclorofenil)metil metilbenceno, mezcla de isómeros (diclorofenil) (dicloroóctil)metano, mezcla de isómeros (IUPAC)

Clasificación,

N ; R 50-53

Etiquetado,

N

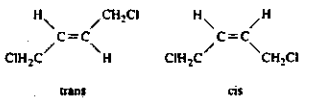
R : 50/53

S : 60-61

Límites de concentración,

Cas No 764-41-0	EEC No 212-121-8	No 602-073-00-X

NOTA E



1,4-diclorobut-2-eno

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T+; R 26	T; R 24/25	C; R 34

Etiquetado,

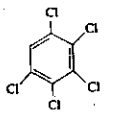
T+

R: 45-24/25-26-34

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 608-93-5	EEC No 210-172-0	No 602-074-00-5



pentaclorobenceno

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 22

Etiquetado,

F Xn

R: 11-22

S: (2-)41-46-50

Límites de concentración,

Cas No 67-56-1	EEC No 200-659-6	No 603-001-00-X

CH_3OH

metanol; alcohol metílico

Clasificación,

F; R 11	T; R 23/25

Etiquetado,

F T

R: 11-23/25

S: (1/2-)7-16-24-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T; R 23/25
3 % ≤ C < 20 %	Xn; R 20/22

Cas No 64-17-5	EEC No 200-578-6	No 603-002-00-5

$CH_3 — CH_2OH$

etanol; alcohol etílico

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)7-16

Límites de concentración,

Cas No 71-23-8 [1] 67-63-0 [2]	EEC No 200-746-9 [1] 200-661-7 [2]	No 603-003-00-0

NOTA C

$CH_3-CH_2-CH_2OH$ [1]

$(CH_3)_2CHOH$ [2]

1-propanol; alcohol propílico [1] 2-propanol; alcohol isopropílico [2]

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)7-16

Límites de concentración,

Cas No 71-36-3 [1] 78-92-2 [2] 78-83-1 [3]	EEC No 200-751-6 [1] 201-158-5 [2] 201-148-0 [3]	No 603-004-00-6

NOTA C

$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2OH$ [1]

$CH_3-CHOH-CH_2-CH_3$ [2]

$(CH_3)_2CH-CH_2OH$ [3]

butanol; alcohol butílico (excepto el 2-metil-2-propanol; alcohol *terc*-butílico)

Clasificación,

R 10	Xn; R 20

Etiquetado,

Xn

R: 10-20

S: (2-)16

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 20

Cas No 75-65-0	EEC No 200-889-7	No 603-005-00-1

$CH_3-C(CH_3)_2-OH$

2-metil-2-propanol; alcohol *terc*-butílico

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20

Etiquetado,

F Xn

R: 11-20

S: (2-)9-16

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 20

Cas No 30899-19-5	EEC No 250-378-8	No 603-006-00-7

NOTA C

$C_5H_{11}OH$

pentanol; alcohol amílico (excepto el 2-metil-2-butanol; alcohol terc-amílico)

Clasificación,

R 10	Xn; R 20

Etiquetado,

Xn

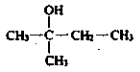
R: 10-20

S: (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 20

Cas No 75-85-4 | EEC No 200-908-9 | No 603-007-00-2



2-metil-2-butanol ; alcohol terc-amílico

Clasificación,

F ; R 11	Xn ; R 20

Etiquetado,

F Xn

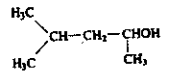
R : 11-20

S : (2-)9-16-24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20

Cas No 108-11-2 | EEC No 203-551-7 | No 603-008-00-8



4-metil-2-pentanol ; alcohol metilamílico

Clasificación,

R 10	Xi ; R 37

Etiquetado.

Xi

R : 10-37

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xi ; R 37

Cas No 108-93-0 | EEC No 203-630-6 | No 603-009-00-3

ciclohexanol

Clasificación,

Xn ; R 20/22	Xi ; R 37/38

Etiquetado.

Xn

R : 20/22-37/38

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20/22-37/38
20 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 37/38

Cas No 583-59-5 | EEC No 209-512-0 | No 603-010-00-9

2-metilciclohexanol

Clasificación,

Xn ; R 20

Etiquetado.

Xn

R : 20

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20

Cas No 109-86-4	EEC No 203-713-7	No 603-011-00-4

NOTA E

$CH_3 — O — CH_2 — CH_2 — OH$

2-metoxietanol; éter monometílico de etilenglicol; metilglicol

Clasificación.

R 10	Repr. Cat. 2; R 60-61	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

T

R: 60-61-10-20/21/22

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 110-80-5	EEC No 203-804-1	No 603-012-00-X

NOTA E

$C_2H_5 — O — CH_2 — CH_2OH$

2-etoxietanol; éter monoetílico del etilenglicol; etilglicol

Clasificación.

R 10	Repr. Cat. 2; R 60-61	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

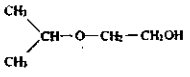
T

R: 60-61-10-20/21/22

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 109-59-1	EEC No 203-685-6	No 603-013-00-5



2-isopropoxietanol; éter monoisopropílico del etilenglicol; isopropilglicol

Clasificación.

Xn; R 20/21	Xi; R 36

Etiquetado.

Xn

R: 20/21-36

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 20/21-36
20 % ≤ C < 25 %	Xi; R 36

Cas No 111-76-2	EEC No 203-905-0	No 603-014-00-0

$C_4H_9 — O — CH_2 — CH_2OH$

2-butoxietanol; éter monobutílico del etilenglicol; butilglicol

Clasificación.

Xn; R 20/21/22	Xi; R 37

Etiquetado.

Xn

R: 20/21/22-37

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xn; R 20/21/22-37
12,5 % ≤ C < 20 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 107-18-6 | EEC No 203-470-7 | No 603-015-00-6

$CH_2 = CH - CH_2 - OH$

alcohol alílico

Clasificación,

R 10	T; R 23/24/25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

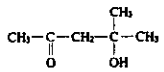
T

R: 10-23/24/25-36/37/38

S: (1/2-)36/37/39-38-45

Límites de concentración,

Cas No 123-42-2 | EEC No 204-626-7 | No 603-016-00-1



4-hidroxi-4-metil-pentanona; alcohol de diacetona

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

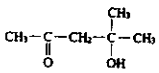
R: 36

S: (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36

Cas No 123-42-2 | EEC No 204-626-7 | No 603-017-00-7



4-hidroxi-4-metil-2-pentanona técnico; alcohol de diacetona técnico

Clasificación,

F; R 11	Xi; R 36

Etiquetado,

F Xi

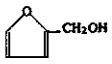
R: 11-36

S: (2-)7-16-24/25

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36

Cas No 98-00-0 | EEC No 202-626-1 | No 603-018-00-2



alcohol furfurílico

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R: 20/21/22

S: (2)

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 115-10-6 | EEC No 204-065-8 | No 603-019-00-8

éter dimetílico; dimetileter

Clasificación.

F+ ; R 12

Etiquetado.

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración.

Cas No 540-67-0 | EEC No — | No 603-020-00-3

$CH_3 — O — C_2H_5$

éter etilmetílico; etilmetileter

Clasificación.

F+ ; R 12

Etiquetado.

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración.

Cas No 107-25-5 | EEC No 203-475-4 | No 603-021-00-9

NOTA D

$CH_3 — O — CH = CH_2$

éter metilvinílico; metilvinileter

Clasificación.

F+ ; R 12

Etiquetado.

F+

R : 12

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración.

Cas No 60-29-7 | EEC No 200-467-2 | No 603-022-00-4

éter dietílico; dietileter

Clasificación.

F+ ; R 12 | R 19

Etiquetado.

F+

R : 12-19

S : (2-)9-16-29-33

Límites de concentración.

Cas No 75-21-8	EEC No 200-849-9	No 603-023-00-X

NOTA E

óxido de etileno; oxirano

Clasificación,

F+; R 12	Carc. Cat. 2; R 45	Muta. Cat. 2; R 46	T; R 23	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

F+ T

R: 45-46-12-23-36/37/38

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 123-91-1	EEC No 204-661-8	No 603-024-00-5

1,4-dioxano

Clasificación,

F; R 11-19	Carc. Cat. 3; R 40	Xi; R 36/37

Etiquetado,

F Xn

R: 11-19-36/37-40

S: (2-)16-36/37

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn; R 40-36/37
1 % ≤ C < 20 %	Xn; R 40

Cas No 109-99-9	EEC No 203-726-8	No 603-025-00-0

tetrahidrofurano

Clasificación,

F; R 11-19	Xi; R 36/37

Etiquetado,

F Xi

R: 11-19-36/37

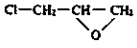
S: (2-)16-29-33

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xi; R 36/37

Cas No 106-89-8	EEC No 203-439-8	No 603-026-00-6

NOTA E



1-cloro-2,3-epoxipropano; epiclorohidrina

Clasificación,

R 10	Carc. Cat. 2; R 45	T; R 23/24/25	C; R 34	R 43

Etiquetado,

T

R: 45-10-23/24/25-34-43

S: 53-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	T; R 45-23/24/25-34-43
5 % ≤ C < 10 %	T; R 45-23/24/25-36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	T; R 45-23/24/25-43
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 107-21-1	EEC No 203-473-3	No 603-027-00-1

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

etanodiol ; etilenglicol

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 22

Cas No 107-07-3	EEC No 203-459-7	No 603-028-00-7

$$\begin{array}{l} CH_2Cl \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

2-cloroetanol ; etilen-clorhidrina

Clasificación.

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado.

T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)7/9-28-45

Límites de concentración.

C ≥ 7 %	T+ ; R 26/27/28
1 % ≤ C < 7 %	T ; R 23/24/25
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 111-44-4	EEC No 203-870-1	No 603-029-00-2

$$ClCH_2 — CH_2 — O — CH_2 — CH_2Cl$$

éter 2,2'-dicloroetílico ; bis-(2-cloroetil)éter

Clasificación.

R 10	T+ ; R 26/27/28	Xn ; R 40

Etiquetado.

T+

R : 10-26/27/28-40

S : (1/2-)7/9-27-38-45

Límites de concentración.

C ≥ 7 %	T+ ; R 26/27/28-40
1 % ≤ C < 7 %	T ; R 23/24/25-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 141-43-5	EEC No 205-483-3	No 603-030-00-8

$$H_2N — CH_2 — CH_2OH$$

2-aminoetanol ; etanolamina

Clasificación.

Xn ; R 20	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

Xn

R : 20-36/37/38

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 110-71-4	EEC No 203-794-9	No 603-031-00-3

$$CH_3-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$$

1,2-dimetoxietano; éter dimetílico del etilenglicol

Clasificación.

R 10	R 19	Xn; R 20.

Etiquetado.

Xn

R: 10-19-20

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

Cas No 628-96-6	EEC No 211-063-0	No 603-032-00-9

$$\begin{array}{l} CH_2-O-NO_2 \\ | \\ CH_2-O-NO_2 \end{array}$$

dinitrato de etilenglicol

Clasificación.

E; R 2	T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

E T+

R: 2-26/27/28-33

S: (1/2-)33-35-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 693-21-0	EEC No 211-745-8	No 603-033-00-4

$$\begin{array}{l} CH_2-O-NO_2 \\ | \\ CH_2 \\ \quad\diagdown O \\ \quad\diagup \\ CH_2 \\ | \\ CH_2-O-NO_2 \end{array}$$

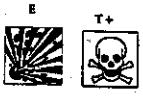
dinitrato de dietilenglicol

Clasificación.

E; R 3	T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

E T+



R: 3-26/27/28-33

S: (1/2-)33-35-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 55-63-0	EEC No 200-240-8	No 603-034-00-X

$$\begin{array}{l} CH_2-O-NO_2 \\ | \\ CH\ -O-NO_2 \\ | \\ CH_2-O-NO_2 \end{array}$$

trinitrato de glicerol; nitroglicerina

Clasificación.

E; R 3	T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

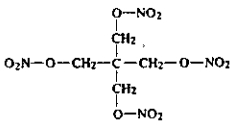
E T+

R: 3-26/27/28-33

S: (1/2-)33-35-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 78-11-5 | EEC No 201-084-3 | No 603-035-00-5



tetranitrato de pentaeritritol; pentrita

Clasificación,

E; R 3

Etiquetado,

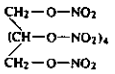
E

R: 3

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No 15825-70-4 | EEC No 239-924-6 | No 603-036-00-0



hexanitrato de manitol; nitromanitol

Clasificación,

E; R 3

Etiquetado,

E

R: 3

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 603-037-00-6

nitrato de celulosa; nitrocelulosa, conteniendo más de 12,6 % de nitrógeno

Clasificación,

E; R 3 | R 1

Etiquetado,

E

R: 1-3

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 603-037-01-3

nitrato de celulosa; nitrocelulosa, conteniendo menos de 12,6 % de nitrógeno

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

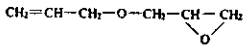
F

R: 11

S: (2-)16-33-37/39

Límites de concentración,

Cas No 106-92-3 | EEC No 203-442-4 | No 603-038-00-1



alil-2,3-epoxipropileter-1 ; éter de alilo y de glicidilo

Clasificación,

Xn ; R 20	R 43

Etiquetado,

Xn

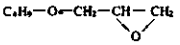
R : 20-43

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20-43
1 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 43

Cas No 2426-08-6 | EEC No 219-376-4 | No 603-039-00-7



butil-2,3-epoxipropileter ; éter de n-butilo y de glicidilo

Clasificación,

Xn ; R 20	R 43

Etiquetado,

Xn

R : 20-43

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20-43
1 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 43

Cas No — | EEC No — | No 603-040-00-2

NOTA A

$M[OCH_3]$

metóxidos alcalinos ; metilatos alcalinos

Clasificación,

F ; R 11	R 14	C ; R 34

Etiquetado,

F C

R : 11-14-34

S : (1/2-)8-16-26-43-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 603-041-00-8

NOTA A

$M[OC_2H_5]$

etóxidos alcalinos ; etilatos alcalinos

Clasificación,

F ; R 11	R 14	C ; R 34

Etiquetado,

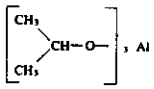
F C

R : 11-14-34

S : (1/2-)8-16-26-43-45

Límites de concentración,

Cas No 555-31-7 | EEC No 209-090-8 | No 603-042-00-3



isopropóxido de aluminio; isopropilato de aluminio

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

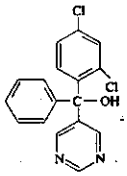
F

R: 11

S: (2-)8-16

Límites de concentración.

Cas No 26766-27-8 | EEC No — | No 603-043-00-9



triarimol; (2,4-diclorofenil)(fenil)(5-pirimidinil)metanol

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

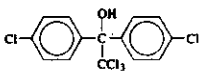
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 115-32-2 | EEC No 204-082-0 | No 603-044-00-4



dicofol (ISO); 2,2,2-tricloro-1,1-bis-(4-clorofenil)etanol

Clasificación.

Xn; R 21/22	Xi; R 38	R 43

Etiquetado.

Xn

R: 21/22-38-43

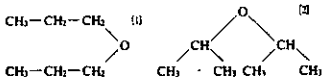
S: (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 111-43-3 [1]
108-20-3 [2]

EEC No 203-869-6 [1]
203-560-6 [2]

No 603-045-00-X



éter dipropílico [1] y éter diisopropílico [2]

Clasificación.

F; R 11	R 19

Etiquetado.

F

R: 11-19

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración.

Cas No 542-88-1 | EEC No 208-832-8 | No 603-046-00-5

NOTA E

$Cl-CH_2-O-CH_2-Cl$

éter diclorometílico; éter bisclorometílico

Clasificación,

R 10	Carc. Cat. 1; R 45	T+; R 26	T; R 24	Xn; R 22

Etiquetado,

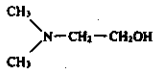
T+

R: 45-10-22-24-26

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 108-01-0 | EEC No 203-542-8 | No 603-047-00-0



2-dimetilaminoetanol

Clasificación,

R 10	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

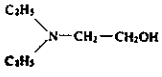
Xi

R: 10-36/37/38

S: (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 100-37-8 | EEC No 202-845-2 | No 603-048-00-6



2-dietilaminoetanol

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

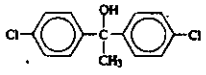
Xi

R: 36/37/38

S: (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 80-06-8 | EEC No 201-246-3 | No 603-049-00-1



clorfenetol (ISO); 1,1-bis(4-clorofenil)etanol

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

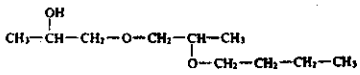
Xn

R: 22

S: (2-)36

Límites de concentración,

Cas No 24083-03-2 | EEC No 246-011-6 | No 603-050-00-7



1-(2-butoxipropoxi)-2-propanol

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

Xn

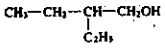
R: 21/22

S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 21/22

Cas No 97-95-0 | EEC No 202-621-4 | No 603-051-00-2



2-etil-1-butanol

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

Xn

R: 21/22

S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 21/22

Cas No 5131-66-8 | EEC No 225-878-4 | No 603-052-00-8

$C_4H_9 - O - CH_2 - CHOH - CH_3$

3-butoxi-2-propanol

Clasificación.

Xi; R 36/38

Etiquetado.

Xi

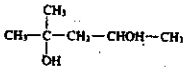
R: 36/38

S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38

Cas No 107-41-5 | EEC No 203-489-0 | No 603-053-00-3



2-metil-2,4-pentanodiol

Clasificación.

Xi; R 36/38

Etiquetado.

Xi

R: 36/38

S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 142-96-1 | EEC No 205-575-3 | No 603-054-00-9

$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_3$

éter di-n-butílico; óxido de dibutilo

Clasificación.

R 10	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

R: 10-36/37/38

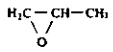
S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 75-56-9 | EEC No 200-879-2 | No 603-055-00-4

NOTA E



óxido de propileno; 1,2-epoxipropano; metiloxirano

Clasificación.

F+; R 12	Carc. Cat. 2; R 45	Xn; R 20/21/22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

F+ T

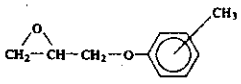
R: 45-12-20/21/22-36/37/38

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 26447-14-3 | EEC No 247-711-4 | No 603-056-00-X

NOTA C



éter de 1,2-epoxipropiltolilo; óxido de glicidilo y de tolilo

Clasificación.

Xi; R 38

Etiquetado.

Xi

R: 38

S: (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 2 %	Xi; R 38

Cas No 100-51-6 | EEC No 202-859-9 | No 603-057-00-5

alcohol bencílico

Clasificación.

Xn; R 20/22

Etiquetado.

Xn

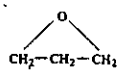
R: 20/22

S: (2-)26

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 20/22

Cas No 503-30-0	EEC No 207-964-3	No 603-058-00-0



1,3-epoxipropano; óxido de trimetileno

Clasificación.

F; R 11	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

F Xn

R: 11-20/21/22

S: (2-)9-16-26-29

Límites de concentración.

Cas No 111-27-3	EEC No 203-852-3	No 603-059-00-6

$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2OH$

1-hexanol

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

Xn

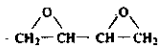
R: 22

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 22

Cas No 1464-53-5	EEC No 215-979-1	No 603-060-00-1



1,2,3,4-diepoxi-butano

Clasificación.

T; R 23/24/25	Xi; R 36/37/38	Xn; R 40	R 42/43

Etiquetado.

T

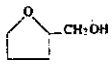
R: 23/24/25-36/37/38-40-42/43

S: (1/2-)23-24-45

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	T; R 23/24/25-36/37/38-40-42/43
1 % ≤ C < 20 %	T; R 23/24/25-40-42/43
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22-42/43

Cas No 97-99-4	EEC No 202-625-6	No 603-061-00-7



2-hidroximetiltetrahidrofurano; alcohol tetrahidrofurfurílico

Clasificación.

Xi; R 36

Etiquetado.

Xi

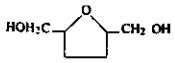
R: 36

S: (2-)39

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 36

Cas No 104-80-3 | EEC No 203-239-0 | No 603-062-00-2



2,5-dihidroximetiltetrahidrofurano

Clasificación.

Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

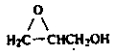
R: 36/37/38

S: (2-)39

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 556-52-5 | EEC No 209-128-3 | No 603-063-00-8



2,3-epoxi-1-propanol; glicidol

Clasificación.

T; R 23	Xn; R 21/22	Xi; R 36/37/38	R 42/43

Etiquetado.

T

R: 23-21/22-36/37/38-42/43

S: (1/2-)45

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	T; R 23-21/22-36/37/38-42/43
5 % ≤ C < 20 %	T; R 23-21/22-42/43
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21/22-42/43

Cas No 107-98-2 | EEC No 203-539-1 | No 603-064-00-3

$CH_3 — CHOH — CH_2 — O — CH_3$

1-metoxi-2-propanol; éter monometílico del propilenglicol

Clasificación.

R 10

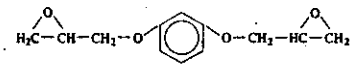
Etiquetado.

R: 10

S: (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 101-90-6 | EEC No 202-987-5 | No 603-065-00-9



1,3-bis(2,3-epoxipropoxi)bencano; éter diglicido del resorcinol

Clasificación.

T; R 23/24/25	Xn; R 40	R 43

Etiquetado.

T

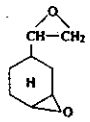
R: 23/24/25-40-43

S: (1/2-)23-24-45

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	T; R 23/24/25-40-43
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 106-87-6 | EEC No 203-437-7 | No 603-066-00-4



1-epoxietil-3,4-epoxiciclohexano; diepóxido del vinilciclohexano

Clasificación.

T; R 23/24/25	Xn; R 40

Etiquetado.

T

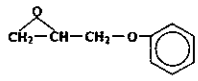
R: 23/24/25-40

S: (1/2-)23-24-45

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	T; R 23/24/25-40
0,1 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 122-60-1 | EEC No 204-557-2 | No 603-067-00-X



1,2-epoxi-3-fenoxipropano; óxido de glicidilo y de fenilo

Clasificación.

Xn; R 21	R 43

Etiquetado.

Xn

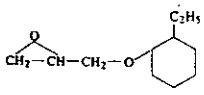
R: 21-43

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 21-43
1 % ≤ C < 25 %	Xi; R 43

Cas No 130014-35-6 | EEC No — | No 603-068-00-5



1-(2-etilciclohexiloxi)-2,3-epoxipropano; óxido de 2-etilciclohexilo y de glicidilo

Clasificación.

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

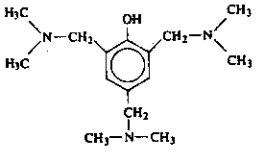
R: 36/38-43

S: (2-)26-28-37/39

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi: R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 90-72-2 | EEC No 202-013-9 | No 603-069-00-0



2,4,6-tris(dimetilaminometil)fenol

Clasificación.

Xn; R 22	Xi; R 36/38

Etiquetado.

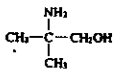
Xn

R: 22-36/38

S: (2-)26-28

Límites de concentración.

Cas No 124-68-5 | EEC No 204-709-8 | No 603-070-00-6



2-amino-2-metil-1-propanol

Clasificación,

Xi ; R 36/38

Etiquetado,

Xi

R : 36/38

S : (2)

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi ; R 36/38

Cas No 111-42-2 | EEC No 203-868-0 | No 603-071-00-1

$HOCH_2 — CH_2 — NH — CH_2 — CH_2OH$

2,2'-iminodietanol ; dietanolamina

Clasificación,

Xi ; R 36/38

Etiquetado,

Xi

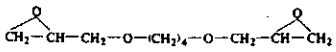
R : 36/38

S : (2-)26

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi ; R 36/38

Cas No 2425-79-8 | EEC No 219-371-7 | No 603-072-00-7



1,4-bis(2,3-epoxipropoxi)butano ; éter diglicídico del 1,4-butanodiol

Clasificación,

Xn ; R 20/21 | Xi ; R 36/38 | R 43

Etiquetado,

Xn

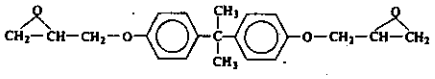
R : 20/21-36/38-43

S : (2-)26-28-37/39

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 20/21-36/38-43
20 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi ; R 43

Cas No 1675-54-3 | EEC No 216-823-5 | No 603-073-00-2



2,2-bis-[4-(2,3-epoxipropoxi)fenil]propano

Clasificación,

Xi ; R 36/38 | R 43

Etiquetado,

Xi

R : 36/38-43

S : (2-)28-37/39

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 25068-38-6	EEC No —	No 603-074-00-8

producto de reacción : bisfenol-A-epiclorhidrina ; resinas epoxi (peso molecular medio ≤ 700)

Clasificación.

Xi ; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R : 36/38-43

S : (2-)28-37/39

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 107-30-2	EEC No 203-480-1	No 603-075-00-3

NOTA E

$CH_3 — O — CH_2Cl$

éter clorometil-metilo

Clasificación.

F ; R 11	Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

F T

R : 45-11-20/21/22

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 110-65-6	EEC No 203-788-6	No 603-076-00-9

$HO—CH_2—C≡C—CH_2OH$

but-2-ino-1,4-diol ; 2-butino-1,4-diol

Clasificación.

T ; R 25	C ; R 34

Etiquetado.

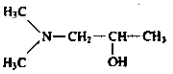
T

R : 25-34

S : (1/2-)22-36-45

Límites de concentración.

Cas No 108-16-7	EEC No 203-556-4	No 603-077-00-4



1-dimetilaminopropan-2-ol ; dimepranol (DCI)

Clasificación.

R 10	Xn ; R 22	C ; R 34

Etiquetado.

C

R : 10-22-34

S : (1/2-)23-26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 107-19-7 | EEC No 203-471-2 | No 603-078-00-X

$HC \equiv C - CH_2 - OH$

prop-2-ino-1-ol; 2-propino-1-ol; alcohol propargílico

Clasificación,

R 10	T; R 23/24/25	C; R 34

Etiquetado,

T

R: 10-23/24/25-34

S: (1/2-)26-28-36-45

Límites de concentración,

Cas No 105-59-9 | EEC No 203-312-7 | No 603-079-00-5

$$\begin{array}{l} CH_2CH_2OH \\ | \\ N-CH_3 \\ | \\ CH_2CH_2OH \end{array}$$

2,2'-metiliminodietanol; N-metildietanolamina

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R: 36

S: (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 109-83-1 | EEC No 203-710-0 | No 603-080-00-0

$CH_3 - NH - CH_2 - CH_2 - OH$

2-metilaminoetanol; N-metil-2-etanolamina

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)23-26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 111-48-8 | EEC No 203-874-3 | No 603-081-00-6

$HO - CH_2 - CH_2 - S - CH_2 - CH_2 - OH$

2,2'-tiodietanol; tiodiglicol

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

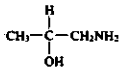
Xi

R: 36

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 78-96-6 | EEC No 201-162-7 | No 603-082-00-1



1-aminopropan-2-ol ; isopropanolamina

Clasificación,

C ; R 34

Etiquetado,

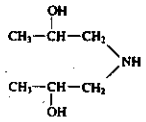
C

R : 34

S : (1/2-)23-26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 110-97-4 | EEC No 203-820-9 | No 603-083-00-7



1,1'-iminodipropan-2-ol ; diisopropanolamina

Clasificación,

Xi ; R 36

Etiquetado,

Xi

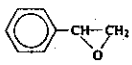
R : 36

S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 96-09-3 | EEC No 202-476-7 | No 603-084-00-2

NOTA E



óxido de estireno ; (epoxietil)benceno ; feniloxirano

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 21	Xi ; R 36

Etiquetado,

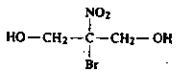
T

R : 45-21-36

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 52-51-7 | EEC No 200-143-0 | No 603-085-00-8



bronopol (DCI) ; 2-bromo-2-nitropropanodiol

Clasificación,

T ; R 25

Etiquetado,

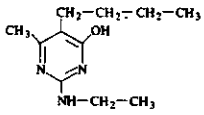
T

R : 25

S : (1/2-)24/25-37-45

Límites de concentración,

Cas No 23947-60-6 | EEC No 245-949-3 | No 603-086-00-3



etirimol (ISO); 5-butil-2-etilamino-6-metilpirimidina-4-ol

Clasificación,

Xn; R 21

Etiquetado,

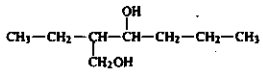
Xn

R: 21

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 54-96-2 | EEC No 202-377-9 | No 603-087-00-9



2-etilhexano-1,3-diol; octilenglicol

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R: 36

S: (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 3547-33-9 | EEC No 222-598-4 | No 603-088-00-4

$$CH_3(CH_2)_7 - S - CH_2 - CH_2OH$$

2-(octiltio)etanol; sulfuro de 2-hidroxietilo y octilo

Clasificación,

Xi; R 41

Etiquetado,

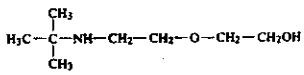
Xi

R: 41

S: (2-)26

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-390-6 | No 603-089-00-X



7,7-dimetil-3-oxa-6-azaoctan-1-ol

Clasificación,

C; R 35 | Xn; R 22

Etiquetado,

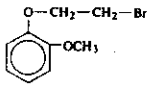
C

R: 22-35

S: (1/2-)26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 4463-59-6 | EEC No 402-010-4 | No 603-090-00-5



2-(2-bromoetoxi)anisol

Clasificación.

Xn ; R 22	R 52-53

Etiquetado.

Xn

R : 22-52/53

S : (2-)22-61

Límites de concentración.

Cas No 107133-87-9 AND 87172-89-2 | EEC No 402-470-6 | No 603-091-00-0

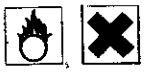
exo-4-isopropil-1-metil-1,4-epoxiciclohexan-2-ol

Clasificación.

O ; R 8	Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado.

O Xn

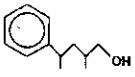


R : 8-22-36

S : (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 92585-24-5 | EEC No 402-770-7 | No 603-092-00-6



4-fenil-2-metilpentanol

Clasificación.

R 43	N ; R 51-53

Etiquetado.

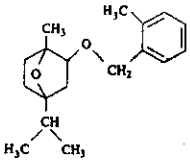
Xi N

R : 43-51/53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración.

Cas No 87818-31-3 & 89368-00-3 | EEC No 402-410-9 | No 603-093-00-1



exo-(+/)-1-metil-2-(2-metilbenziloxi)-4-isopropil-7-oxabiciclo(2.2.1)heptano

Clasificación.

Xn ; R 20	N ; R 51-53

Etiquetado.

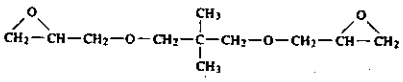
Xn N

R : 20-51/53

S : (2-)22-61

Límites de concentración.

Cas No 17557-23-2 | EEC No 241-536-7 | No 603-094-00-7



1,3-bis(2,3-epoxipropoxi)-2,2-dimetilpropano

Clasificación.

Xi ; R 38 | R 43

Etiquetado.

Xi

R : 38-43

S : (2-)24-37

Límites de concentración.

Cas No 2507-30-9 | EEC No 220-548-6 | No 603-095-00-2

$CH_3 - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - OH$

2-(propiloxi)etanol

Clasificación.

R 10 | Xn ; R 21 | Xi ; R 36

Etiquetado.

Xn

R : 10-21-36

S : (2-)24/25-36/37

Límites de concentración.

Cas No 112-34-5 | EEC No 203-961-6 | No 603-096-00-8

$C_4H_9 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - OH$

2-(2-butoxiethoxi)etanol

Clasificación.

Xi ; R 36

Etiquetado.

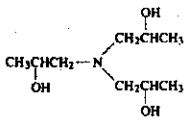
Xi

R : 36

S : (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 122-20-3 | EEC No 204-528-4 | No 603-097-00-3



1,1',1"-nitrilotripropan-2-ol

Clasificación.

Xi ; R 36

Etiquetado.

Xi

R : 36

S : (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 122-99-6	EEC No 204-589-7	No 603-098-00-9

$C_6H_5 — O — CH_2 — CH_2OH$

2-fenoxietanol

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado,

Xn

R : 22-36

S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 108-95-2	EEC No 203-632-7	No 604-001-00-2

fenol

Clasificación,

T ; R 24/25	C ; R 34

Etiquetado,

T

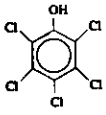
R : 24/25-34

S : (1/2-)28-45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	T ; R 24/25-34
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 21/22-36/38

Cas No 87-86-5	EEC No 201-778-6	No 604-002-00-8



pentaclorofenol

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	T+ ; R 26	T ; R 24/25	Xi ; R 36/37/38	N ; R 50-53

Etiquetado,

T+ N

R : 24/25-26-36/37/38-40-50/53

S : (1/2-)22-36/37-45-52-60-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 604-003-00-3

NOTA A

sales del pentaclorofenol

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	T+ ; R 26	T ; R 24/25	Xi ; R 36/37/38	N ; R 50-53

Etiquetado,

T+ N

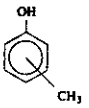
R : 24/25-26-36/37/38-40-50/53

S : (1/2-)22-36/37-45-52-60-61

Límites de concentración,

Cas No 108-39-4 (m) 95-48-7 (o) 106-44-5 (p) 1319-77-3 (mix)	EEC No 203-577-9 (m) 202-423-8 (o) 203-398-6 (p) 215-293-2 (mix)	No 604-004-00-9

NOTA C



metilfenol ; cresol

Clasificación,

T ; R 24/25	C ; R 34

Etiquetado,

T

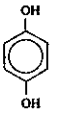
R : 24/25-34

S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	T ; R 24/25-34
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 21/22-36/38

Cas No 123-31-9	EEC No 204-617-8	No 604-005-00-4



1,4-dihidroxibenceno ; hidroquinona

Clasificación,

Xn ; R 20/22

Etiquetado,

Xn

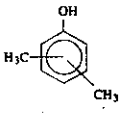
R : 20/22

S : (2-)24/25-39

Límites de concentración,

Cas No 1300-71-6(mix)	EEC No 215-089-3	No 604-006-00-X

NOTA C



xilenol

Clasificación,

T ; R 24/25	C ; R 34

Etiquetado,

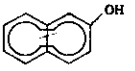
T

R : 24/25-34

S : (1/2-)28-45

Límites de concentración,

Cas No 135-19-3	EEC No 205-182-7	No 604-007-00-5



2-naftol ; β-naftol

Clasificación,

Xn ; R 20/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/22

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No 108-43-0 (m)
95-57-8 (o)
106-48-9 (p)
25167-80-0 (mix)

EEC No 203-582-6 (m)
202-433-2 (o)
203-402-6 (p)
246-691-4 (mix)

No 604-008-00-0

NOTA C

clorofenol

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 87-66-1

EEC No 201-762-9

No 604-009-00-6

1,2,3-bencenotriol ; pirogalol

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

S : (2)

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 108-46-3

EEC No 203-585-2

No 604-010-00-1

1,3-bencenodiol ; resorcinol

Clasificación,

Xn ; R 22 | Xi ; R 36/38

Etiquetado,

Xn

R : 22-36/38

S : (2-)26

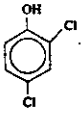
Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn ; R 22-36/38
10 % ≤ C < 20 %	Xn ; R 22

Cas No 120-83-2

EEC No 204-429-6

No 604-011-00-7



2,4-diclorofenol

Clasificación,

Xn ; R 22 | Xi ; R 36/38

Etiquetado,

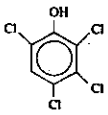
Xn

R : 22-36/38

S : (2-)26-28

Límites de concentración,

Cas No 58-90-2 | EEC No 200-402-8 | No 604-013-00-8



2,3,4,6-tetraclorofenol

Clasificación,

T; R 25	Xi; R 36/38

Etiquetado,

T

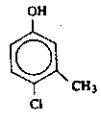
R: 25-36/38

S: (1/2-)26-28-37-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T; R 25-36/38
5 % ≤ C < 20 %	T; R 25
0,5 % ≤ C < 5 %	Xn; R 22

Cas No 59-50-7 | EEC No 200-431-6 | No 604-014-00-3



4-cloro-3-metilfenol; p-cloro-m-cresol

Clasificación,

Xn; R 21/22	Xi; R 38

Etiquetado,

Xn

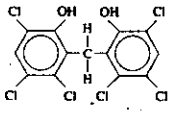
R: 21/22-38

S: (2-)26-28

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn; R 21/22-38
5 % ≤ C < 20 %	Xn; R 21/22

Cas No 70-30-4 | EEC No 200-733-8 | No 604-015-00-9



2,2'-metilen-bis(3,4,6-triclorofenol); hexaclorofeno

Clasificación,

T; R 24/25

Etiquetado,

T

R: 24/25

S: (1/2-)20-37-45

Límites de concentración,

C ≥ 2 %	T; R 24/25
0,2 % ≤ C < 2 %	Xn; R 21/22

Cas No 120-80-9 | EEC No 204-427-5 | No 604-016-00-4

1,2-dihidroxibenceno; pirocatecol

Clasificación,

Xn; R 21/22	Xi; R 36/38

Etiquetado,

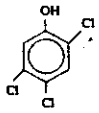
Xn

R: 21/22-36/38

S: (2-)22-26-37

Límites de concentración,

Cas No 95-95-4 | EEC No 202-467-8 | No 604-017-00-X



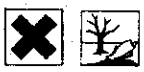
2,4,5-triclorofenol

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/38	N ; R 50-53

Etiquetado,

Xn N



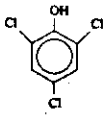
R : 22-36/38-50/53

S : (2-)26-28-60-61

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn ; R 22-36/38
5 % ≤ C < 20 %	Xi ; R 36/38

Cas No 88-06-2 | EEC No 201-795-9 | No 604-018-00-5



2,4,6-triclorofenol

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 22	Xi ; R 36/38

Etiquetado,

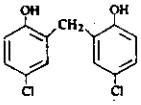
Xn

R : 22-36/38-40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 97-23-4 | EEC No 202-567-1 | No 604-019-00-0



diclorofeno (ISO) ; 4,4'-dicloro-2,2'-metilendifenol

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado,

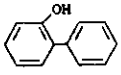
Xn

R : 22-36

S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 90-43-7 | EEC No 201-993-5 | No 604-020-00-6



bifenil-2-ol ; 2-hidroxibifenilo

Clasificación,

Xi ; R 36/38

Etiquetado,

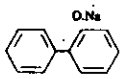
Xi

R : 36/38

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 132-27-4 | EEC No 205-055-6 | No 604-021-00-1



óxido de sodio y de bifenil-2-ilo

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 38-41

Etiquetado,

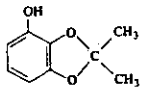
Xn

R : 22-38-41

S : (2-)22-26

Límites de concentración,

Cas No 22961-82-6 | EEC No 400-900-7 | No 604-022-00-7



2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol

Clasificación,

Xi ; R 41

Etiquetado,

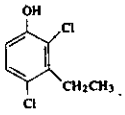
Xi

R : 41

S : (2-)24-26-39

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 401-060-4 | No 604-023-00-2



2,4-dicloro-3-etilfenol

Clasificación,

C ; R 34	N ; R 50-53

Etiquetado,

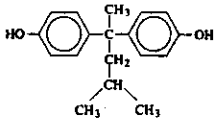
C N

R : 34-50/53

S : (1/2-)26-36/39-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 6807-17-6 | EEC No 401-720-1 | No 604-024-00-8



4,4'-isobutiletilidendifenol

Clasificación,

Xi ; R 36	N ; R 50-53

Etiquetado,

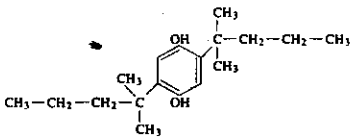
Xi N

R : 36-50/53

S : (2-)26-60-61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-220-0 | No 604-025-00-3



2,5-bis(1,1-dimetilbutil)hidroquinona

Clasificación,

N ; R 51-53

Etiquetado,

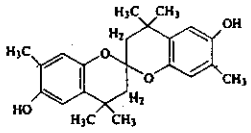
N

R : 51/53

S : 61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-270-3 | No 604-026-00-9



2,2' -espirobi(6-hidroxi-4,4,7-trimetilcromano)

Clasificación,

N ; R 51-53

Etiquetado,

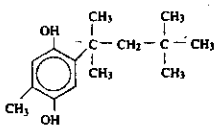
N

R : 51/53

S : 61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-530-6 | No 604-027-00-4



2-metil-5-(1,1,3,3-tetrametilbutil)hidroquinona

Clasificación,

Xi ; R 41	R 43	N ; R 51-53

Etiquetado,

Xi N

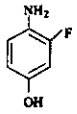
R : 41-43-51/53

S : (2-)24/25-26-37-61

Límites de concentración,

Cas No 399-95-1 | EEC No 402-230-0 | No 604-028-00-X

NOTA E



4-amino-3-fluorofenol

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22	R 43	N ; R 51-53

Etiquetado,

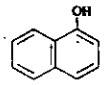
T N

R : 45-22-43-51/53

S : 53-45-61

Límites de concentración,

Cas No 90-15-3 | EEC No 201-969-4 | No 604-029-00-5



1-naftol

Clasificación.

Xn ; R 21/22	Xi ; R 37/38-41

Etiquetado.

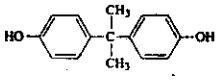
Xn

R : 21/22-37/38-41

S : (2-)22-26-37/39

Límites de concentración.

Cas No 80-05-7 | EEC No 201-245-8 | No 604-030-00-0



4,4'-isopropilidendifenol

Clasificación.

Xi ; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R : 36/37/38-43

S : (2-)24-26-37

Límites de concentración.

Cas No 90-05-1 | EEC No 201-964-7 | No 604-031-00-6

guayacol

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 36/38

Etiquetado.

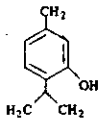
Xn

R : 22-36/38

S : (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 89-83-8 | EEC No 201-944-8 | No 604-032-00-1



timol

Clasificación.

Xn ; R 22	C ; R 34

Etiquetado.

C

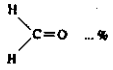
R : 22-34

S : (1/2-)26-28-36/37/39

Límites de concentración.

Cas No 50-00-0 | EEC No 200-001-8 | No 605-001-00-5

NOTA B
NOTA D



formaldehído _ %

Clasificación,

T ; R 23/24/25	C ; R 34	Carc. Cat. 3 ; R 40	R 43

Etiquetado,

T

R : 23/24/25-34-40-43

S : (1/2-)26-36/37-45-51

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	T ; R 23/24/25-34-40-43
5 % ≤ C < 25 %	Xn ; R 20/21/22-36/37/38-40-43
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 40-43

Cas No 110-88-3 | EEC No 203-812-5 | No 605-002-00-0

1,3,5-trioxano ; trioximetileno

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No 75-07-0 | EEC No 200-836-8 | No 605-003-00-6

H_3C-CHO

acetaldehído ; etanal

Clasificación,

F+ ; R 12	Carc. Cat. 3 ; R 40	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

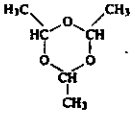
F+ Xn

R : 12-36/37-40

S : (2-)16-33-36/37

Límites de concentración,

Cas No 123-63-7 | EEC No 204-639-8 | No 605-004-00-1



2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano ; paraldehído

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

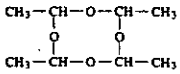
F

R : 11

S : (2-)9-16-29-33

Límites de concentración,

Cas No 108-62-3 | EEC No 203-600-2 | No 605-005-00-7



2,4,6,8-tetrametil-1,3,5,7-tetraoxaciclooctano ; metaldehído

Clasificación,

R 10	Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 10-22

S : (2-)13-25-46

Límites de concentración,

Cas No 123-72-8 | EEC No 204-646-6 | No 605-006-00-2

$CH_3 - (CH_2)_2 - CHO$

butiraldehído

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

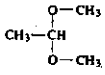
F

R : 11

S : (2-)9-29-33

Límites de concentración,

Cas No 534-15-6 | EEC No 208-589-8 | No 605-007-00-8



1,1-dimetoxietano ; dimetilacetal

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

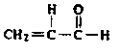
F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 107-02-8 | EEC No 203-453-4 | No 605-008-00-3



aldehído acrílico ; acroleína

Clasificación,

F ; R 11	T+ ; R 26	T ; R 25	C ; R 34

Etiquetado,

F T+

R : 11-25-26-34

S : (1/2-)3/9/14-26-36/37/39-38-45

Límites de concentración,

Cas No 123-73-9 4170-30-3	EEC No 204-647-1 224-030-0	No 605-009-00-9

$CH_3 - CH = CH - CHO$

2-butenal ; crotonaldehido

Clasificación.

F ; R 11	T ; R 23	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

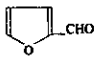
F T

R : 11-23-36/37/38

S : (1/2-)29-33-45

Límites de concentración.

Cas No 98-01-1	EEC No 202-627-7	No 605-010-00-4



2-furaldehido ; furfural

Clasificación.

T ; R 23/25

Etiquetado.

T

R : 23/25

S : (1/2-)24/25-45

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	T ; R 23/25
1 % ≤ C < 5 %	Xn ; R 20/22

Cas No 89-98-5	EEC No 201-956-3	No 605-011-00-X

2-clorobenzaldehido ; o-clorobenzaldehido

Clasificación.

C ; R 34

Etiquetado.

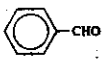
C

R : 34

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración.

Cas No 100-52-7	EEC No 202-860-4	No 605-012-00-5



benzaldehido

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

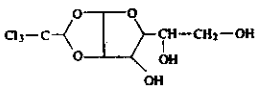
Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 15879-93-3	EEC No 240-016-7	No 605-013-00-0



cloralosa (DCI); (R)-1,2-O-(2,2,2-tricloroetiliden)-α-D-glucofuranosa; glucocloralosa; anhidroglucocloral

Clasificación,

Xn; R 20/22

Etiquetado,

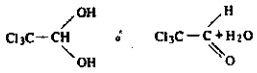
Xn

R: 20/22

S: (2-)16-24/25-28

Límites de concentración,

Cas No 302-17-0	EEC No 206-117-5	No 605-014-00-6



2,2,2-tricloro-1,1-etanodiol; hidrato de cloral

Clasificación,

T; R 25	Xi; R 36/38

Etiquetado,

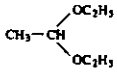
T

R: 25-36/38

S: (1/2-)25-45

Límites de concentración,

Cas No 105-57-7	EEC No 203-310-6	No 605-015-00-1



1,1-dietoxietano; acetal

Clasificación,

F; R 11	Xi; R 36/38

Etiquetado,

F Xi

R: 11-36/38

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 107-22-2	EEC No 203-474-9	No 605-016-00-7

NOTA B

etano-1,2-diona; glioxal ... %

Clasificación,

Xi; R 36/38

Etiquetado,

Xi

R: 36/38

S: (2-)26-28

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 646-06-0 | EEC No 211-463-5 | No 605-017-00-2

1,3-dioxolano

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)16

Límites de concentración,

Cas No 123-38-6 | EEC No 204-623-0 | No 605-018-00-8

$CH_3 — CH_2 — CHO$

propanal; aldehído propiónico

Clasificación,

F; R 11 | Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

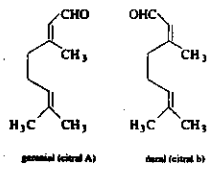
F Xi

R: 11-36/37/38

S: (2-)9-16-29

Límites de concentración,

Cas No 5392-40-5 | EEC No 226-394-6 | No 605-019-00-3



citral

Clasificación,

Xi; R 38 | R 43

Etiquetado,

Xi

R: 38-43

S: (2-)24/25-37

Límites de concentración,

Cas No 67-64-1 | EEC No 200-662-2 | No 606-001-00-8

$CH_3 — C(=O) — CH_3$

propanona; acetona

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

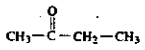
F

R: 11

S: (2-)9-16-23-33

Límites de concentración,

Cas No 78-93-3 | EEC No 201-159-0 | No 606-002-00-3



butanona ; metiletilcetona

Clasificación.

F ; R 11	Xi ; R 36/37

Etiquetado.

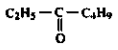
F Xi

R : 11-36/37

S : (2-)9-16-25-33

Límites de concentración.

Cas No 106-35-4 | EEC No 203-388-1 | No 606-003-00-9



3-heptanona ; etilbutilcetona

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20	Xi ; R 36

Etiquetado.

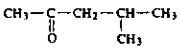
Xn

R : 10-20-36

S : (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 108-10-1 | EEC No 203-550-1 | No 606-004-00-4



4-metil-2-pentanona ; metilisobutilcetona

Clasificación.

F ; R 11

Etiquetado.

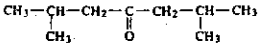
F

R : 11

S : (2-)9-16-23-33

Límites de concentración.

Cas No 108-83-8 | EEC No 203-620-1 | No 606-005-00-X



2,6-dimetil-4-heptanona ; diisobutilcetona

Clasificación.

R 10	Xi ; R 37

Etiquetado.

Xi

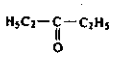
R : 10-37

S : (2-)24

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi ; R 37

Cas No 96-22-0 | EEC No 202-490-3 | No 606-006-00-5



3-pentanona ; dietilcetona

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

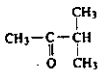
F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 563-80-4 | EEC No 209-264-3 | No 606-007-00-0



3-metil-2-butanona ; metilisopropilcetona

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

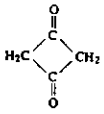
F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 15506-53-3 | EEC No — | No 606-008-00-6



ciclobutano-1,3-diona

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

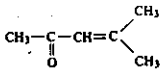
F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 141-79-7 | EEC No 205-502-5 | No 606-009-00-1



4-metil-3-penten-2-ona ; óxido de mesitilo

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 10-20/21/22

S : (2-)25

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 108-94-1 | EEC No 203-631-1 | No 606-010-00-7

ciclohexanona

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20

Etiquetado.

Xn

R : 10-20

S : (2-)25

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 20

Cas No 583-60-8 | EEC No 209-513-6 | No 606-011-00-2

2-metilciclohexanona

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20

Etiquetado.

Xn

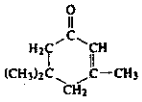
R : 10-20

S : (2-)25

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 20

Cas No 78-59-1 | EEC No 201-126-0 | No 606-012-00-8



3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ona ; isoforona

Clasificación.

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

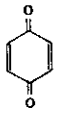
R : 36/37/38

S : (2-)26

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 106-51-4 | EEC No 203-405-2 | No 606-013-00-3



p-benzoquinona ; quinona

Clasificación.

T ; R 23/25	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

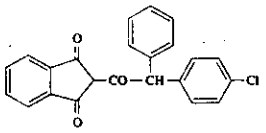
T

R : 23/25-36/37/38

S : (1/2-)26-28-45

Límites de concentración.

Cas No 3691-35-8 | EEC No 223-003-0 | No 606-014-00-9



clorofacinona (ISO); 2-(alfa-(4-clorofenil)fenilacetil)indano-1,3-diona

Clasificación.

T+; R 27/28	T; R 23-48/24/25

Etiquetado.

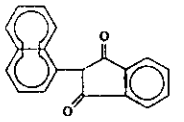
T+

R: 23-27/28-48/24/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 1786-03-4 | EEC No — | No 606-015-00-4



2-(1-naftil)indano-1,3-diona; naftilindandiona

Clasificación.

T; R 25

Etiquetado.

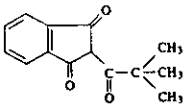
T

R: 25

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración.

Cas No 83-26-1 | EEC No 201-462-8 | No 606-016-00-X



pindona; 2-pivaloil-indano-1,3-diona

Clasificación.

T; R 25-48/25

Etiquetado.

T

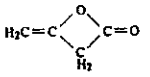
R: 25-48/25

S: (1/2-)37-45

Límites de concentración.

Cas No 674-82-8 | EEC No 211-617-1 | No 606-017-00-5

NOTA D



4-metilen-2-oxetanona; diceteno

Clasificación.

R 10	Xn; R 20

Etiquetado.

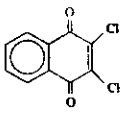
Xn

R: 10-20

S: (2-)3

Límites de concentración.

Cas No 117-80-6 | EEC No 204-210-5 | No 606-018-00-0



diclona (ISO); 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/38

Etiquetado,

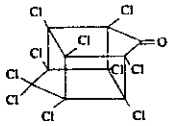
Xn

R: 22-36/38

S: (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 143-50-0 | EEC No 205-601-3 | No 606-019-00-6



clordecon (ISO); decacloropentaciclo (5,2,1,$0^{2,6}$,$0^{5,9}$,$0^{8,10}$) decan-4-ona

Clasificación,

T; R 24/25	Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

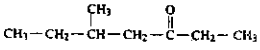
T

R: 24/25-40

S: (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 541-85-5 | EEC No 208-793-7 | No 606-020-00-1



5-metil-3-heptanona

Clasificación,

R 10	Xi; R 36/37

Etiquetado,

Xi

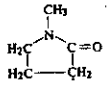
R: 10-36/37

S: (2-)23

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36/37

Cas No 872-50-4 | EEC No 212-828-1 | No 606-021-00-7



N-metil-2-pirrolidona

Clasificación,

Xi; R 36/38

Etiquetado,

Xi

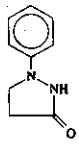
R: 36/38

S: (2-)41

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 92-43-3	EEC No 202-155-1	No 606-022-00-2



1-fenil-3-pirazolidona

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

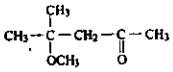
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 107-70-0	EEC No 203-512-4	No 606-023-00-8



4-metil-4-metoxi-2-pentanona

Clasificación.

R 10

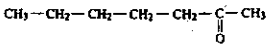
Etiquetado.

R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración.

Cas No 110-43-0	EEC No 203-767-1	No 606-024-00-3



2-heptanona ; amilmetilcetona

Clasificación.

R 10	Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 10-22

S : (2-)23

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 22

Cas No 120-92-3	EEC No 204-435-9	No 606-025-00-9

ciclopentanona

Clasificación.

R 10	Xi ; R 36/38

Etiquetado.

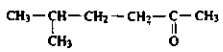
Xi

R : 10-36/38

S : (2-)23

Límites de concentración.

Cas No 110-12-3 | EEC No 203-737-8 | No 606-026-00-4



5-metil-2-hexanona ; isoamilmetilcetona

Clasificación,

R 10

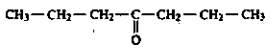
Etiquetado,

R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 123-19-3 | EEC No 204-608-9 | No 606-027-00-X



4-heptanona ; dipropilcetona

Clasificación,

R 10

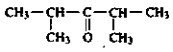
Etiquetado,

R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 565-80-0 | EEC No 209-294-7 | No 606-028-00-5



2,4-dimetil-pentanona ; diisopropilcetona

Clasificación,

F ; R 11

Etiquetado,

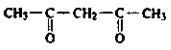
F

R : 11

S : (2-)16-23

Límites de concentración,

Cas No 123-54-6 | EEC No 204-634-0 | No 606-029-00-0



2,4-pentanodiona

Clasificación,

R 10 | Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

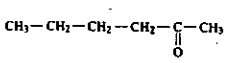
R : 10-22

S : (2-)21-23-24/25

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 22

Cas No 591-78-6	EEC No 209-731-1	No 606-030-00-6



2-hexanona ; metil-n-butilcetona

Clasificación,

F ; R 11	T ; R 48/23

Etiquetado,

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	T ; R 48-23
1 % ≤ C < 10 %	Xn ; R 48/20

Cas No 57-57-8	EEC No 200-340-1	No 606-031-00-1

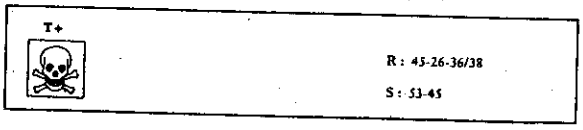
NOTA E

3-propanolido ; 1,3-propiolactona

Clasificación,

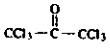
Carc. Cat. 2 ; R 45	T+ ; R 26	Xi ; R 36/38

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 116-16-5	EEC No 204-129-5	No 606-032-00-7



hexacloroacetona

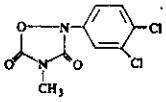
Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Límites de concentración,

Cas No 20354-26-1	EEC No 243-761-6	No 606-033-00-2

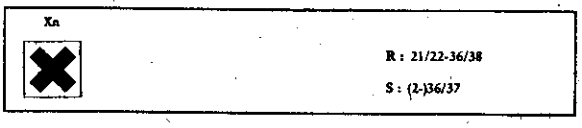


2-(3,4-diclorofenil)-metil-1,2,4-oxadiazolid inadiona

Clasificación,

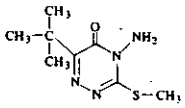
Xn ; R 21/22	Xi ; R 36/38

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 21087-64-9 | EEC No 244-209-7 | No 606-034-00-8



metribuzin (ISO); 4-amino-6-terc-butil-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

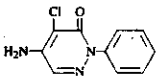
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 1698-60-8 | EEC No 216-920-2 | No 606-035-00-3



5-amino-4-cloro-2-fenilpiridazin-3-ona; pirazona; cloridazon

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

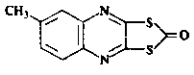
Xi

R: 43

S: (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 2439-01-2 | EEC No 219-455-3 | No 606-036-00-9



chinometionato (ISO); 6-metil-1,3-ditiolo-(4,5-b)quinoxalin-2-ona

Clasificación,

Xi; R 36 | R 43

Etiquetado,

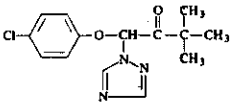
Xi

R: 36-43

S: (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 43121-43-3 | EEC No 256-103-8 | No 606-037-00-4



triadimefon (ISO); 1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)-butanona

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

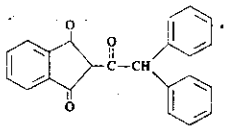
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 82-66-6 | EEC No 201-434-5 | No 606-038-00-X



difacinona (ISO); 2-difenilacetilindano-1,3-diona; difenadiona (DCI)

Clasificación.

T+; R 28	T; R 48/23/24/25

Etiquetado.

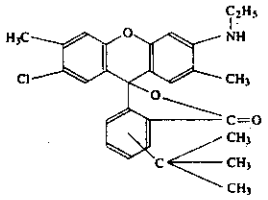
T+

R: 28-48/23/24/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No 400-680-2 | No 606-039-00-5



5(o 6)-terc-butil-2'-cloro-6'-etilamino-3',7'-dimetilespiro(isobenzofuran-1(1H),9'-xanteno)-3-ona

Clasificación.

Xn; R 20	N; R 50-53

Etiquetado.

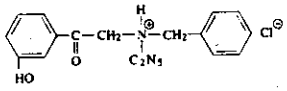
Xn N

R: 20-50/53

S: 60-61

Límites de concentración.

Cas No 55845-90-4 | EEC No 401-840-4 | No 606-040-00-0



(N-bencil-N-etil)amino-3'-hidroxiacetofenona, clorhidrato

Clasificación.

Xi; R 41	N; R 51-53

Etiquetado.

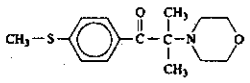
Xi N

R: 41-51/53

S: (2-)26-39-61

Límites de concentración.

Cas No 71868-10-5 | EEC No 400-600-6 | No 606-041-00-6



2-metil-1-(4-metiltiofenil)-2-morfolinopropan-1-ona

Clasificación.

Xn; R 22	N; R 51-53

Etiquetado.

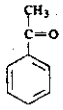
Xn N

R: 22-51/53

S: (2-)22-61

Límites de concentración.

Cas No 98-86-2	EEC No 202-708-7	No 606-042-00-1



acetofenona

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado,

Xn

R : 22-36

S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 64-18-6	EEC No 200-579-1	No 607-001-00-0

NOTA B

HCOOH ... %

ácido fórmico ... %

Clasificación,

C ; R 35

Etiquetado,

C

R : 35

S : (1/2-)23-26-45

Límites de concentración,

C ≥ 90 %	C ; R 35
10 % ≤ C < 90 %	C ; R 34
2 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38

Cas No 64-19-7	EEC No 200-580-7	No 607-002-00-6

NOTA B

CH_3COOH ... %

ácido acético ... %

Clasificación,

R 10	C ; R 35

Etiquetado,

C

R : 10-35

S : (1/2-)23-26-45

Límites de concentración,

C ≥ 90 %	C ; R 35
25 % ≤ C < 90 %	C ; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38

Cas No 79-11-8	EEC No 201-178-4	No 607-003-00-1

$ClCH_2—COOH$

ácido cloroacético

Clasificación,

T ; R 25	C ; R 34

Etiquetado,

T

R : 25-34

S : (1/2-)23-37-45

Límites de concentración,

Cas No 76-03-9 | EEC No 200-927-2 | No 607-004-00-7

$Cl_3C — COOH$

ácido tricloroacético

Clasificación.

C; R 35

Etiquetado.

C

R: 35

S: (1/2-)24/25-26-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	C; R 35
5 % ≤ C < 10 %	C; R 34
1 % ≤ C < 5 %	Xi; R 36/38

Cas No 650-51-1 | EEC No 211-479-2 | No 607-005-00-2

$Cl_3C — COONa$

tricloroacetato de sodio; TCA

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

Xn

R: 22

S: (2-)24-25

Límites de concentración.

Cas No 144-62-7 | EEC No 205-634-3 | No 607-006-00-8

COOH
|
COOH

ácido oxálico

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

Xn

R: 21/22

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xn; R 21/22

Cas No — | EEC No — | No 607-007-00-3

NOTA A

sales de ácido oxálico

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

Xn

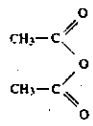
R: 21/22

S: (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xn; R 21/22

Cas No 108-24-7 | EEC No 203-564-8 | No 607-008-00-9



anhídrido acético

Clasificación,

R 10	C; R 34

Etiquetado,

C

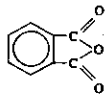
R: 10-34

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	C; R 34
8 % ≤ C < 20 %	Xi; R 36/38

Cas No 85-44-9 | EEC No 201-607-5 | No 607-009-00-4



anhídrido ftálico

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

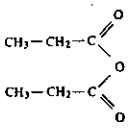
R: 36/37/38

S: (2)

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 123-62-6 | EEC No 204-638-2 | No 607-010-00-X



anhídrido propiónico

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 36/38

Cas No 75-36-5 | EEC No 200-865-6 | No 607-011-00-5

cloruro de acetilo

Clasificación,

F; R 11	R 14	C; R 34

Etiquetado,

F C

R: 11-14-34

S: (1/2-)9-16-26-45

Límites de concentración,

Cas No 98-88-4 | EEC No 202-710-8 | No 607-012-00-0

cloruro de benzoilo

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R: 34

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 616-38-6 | EEC No 210-478-4 | No 607-013-00-6

carbonato de dimetilo

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16

Límites de concentración,

Cas No 107-31-3 | EEC No 203-481-7 | No 607-014-00-1

$HCOOCH_3$

formiato de metilo

Clasificación,

F+; R 12

Etiquetado,

F+

R: 12

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración,

Cas No 109-94-4 | EEC No 203-721-0 | No 607-015-00-7

$HCOOC_2H_5$

formiato de etilo

Clasificación,

F; R 11

Etiquetado,

F

R: 11

S: (2-)9-16-33

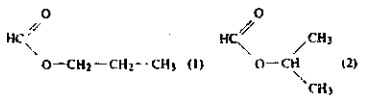
Límites de concentración,

Cas No 110-74-7 [1]
625-55-8 [2]

EEC No 203-798-0 [1]
210-901-2 [2]

No 607-016-00-2

NOTA C



formiato de n-propilo [1], formiato de isopropilo [2]

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración.

Cas No 592-84-7 (n)
589-40-2 (sec)
762-75-4 (tert)

EEC No 209-772-5 (n)
212-105-0 (tert)

No 607-017-00-8

NOTA C

$HCOOC_4H_9$

formiato de butilo

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R : 11

S : (2-)9-16-33

Límites de concentración.

Cas No 638-49-3

EEC No 211-340-6

No 607-018-00-3

NOTA C

$HCOOC_5H_{11}$

formiato de pentilo; formiato de amilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

R : 10

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 79-22-1

EEC No 201-187-3

No 607-019-00-9

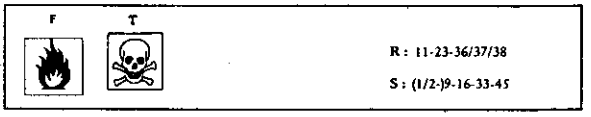
$Cl-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OCH_3$

cloroformiato de metilo

Clasificación.

F; R 11	T; R 23	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 541-41-3 | EEC No 208-778-5 | No 607-020-00-4

$Cl-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OC_2H_5$

cloroformiato de etilo

Clasificación.

F; R 11	T; R 23	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

F T

R: 11-23-36/37/38

S: (1/2-)9-16-33-45

Límites de concentración.

Cas No 79-20-9 | EEC No 201-185-2 | No 607-021-00-X

CH_3COOCH_3

acetato de metilo

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R: 11

S: (2-)16-23-29-33

Límites de concentración.

Cas No 141-78-6 | EEC No 205-500-4 | No 607-022-00-5

$CH_3COOC_2H_5$

acetato de etilo

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R: 11

S: (2-)16-23-29-33

Límites de concentración.

Cas No 108-05-4 | EEC No 203-545-4 | No 607-023-00-0

NOTA D

$CH_3COOCH = CH_2$

acetato de vinilo

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R: 11

S: (2-)16-23-29-33

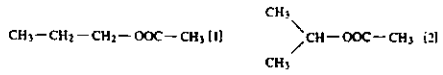
Límites de concentración.

Cas No 109-60-4 [1]
108-21-4 [2]

EEC No 203-686-1 [1]
203-561-1 [2]

No 607-024-00-6

NOTA C



acetato de propilo [1], acetato de isopropilo [2]

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R: 11

S: (2-)16-23-29-33

Límites de concentración.

Cas No 123-86-4

EEC No 204-658-1

No 607-025-00-1

$CH_3COOC_4H_9$

acetato de butilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

R: 10

S: (2)

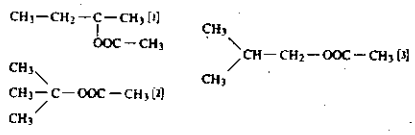
Límites de concentración.

Cas No. 105-46-4 [1]
540-88-5 [2]
110-19-0 [3]

EEC No 203-300-1 [1]
208-760-7 [2]
203-745-1 [3]

No 607-026-00-7

NOTA C



acetato de sec-butilo [1], acetato de ter-butilo [2], acetato de isobutilo [3]

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R: 11

S: (2-)16-23-29-33

Límites de concentración.

Cas No 554-12-1

EEC No 209-060-4

No 607-027-00-2

$CH_3CH_2COOCH_3$

propionato de metilo

Clasificación.

F; R 11

Etiquetado.

F

R: 11

S: (2-)16-23-29-33

Límites de concentración.

Cas No 105-37-3 | EEC No 203-291-4 | No 607-028-00-8

$CH_3CH_2COOC_2H_5$

propionato de etilo

Clasificación.

F ; R 11

Etiquetado.

F

R : 11

S : (2-)16-23-29-33

Límites de concentración.

Cas No 590-01-2 (n)
591-34-4 (sec)
20487-40-5 (tert)
540-42-1(iso)

EEC No 209-669-5 (n)
208-746-0 (iso)

No 607-029-00-3

NOTA C

$CH_3CH_2COOC_4H_9$

propionato de butilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

R : 10

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 106-36-5 | EEC No 203-389-7 | No 607-030-00-9

$CH_3CH_2COOC_3H_7$

propionato de propilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

R : 10

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 109-21-7 | EEC No 203-656-8 | No 607-031-00-4

NOTA C

$CH_3CH_2CH_2COOC_4H_9$

butirato de butilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

R : 10

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 140-88-5	EEC No 205-438-8	No 607-032-00-X

NOTA D

$CH_2{=}CH{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}O{-}C_2H_5$

acrilato de etilo

Clasificación.

F; R 11	Xn; R 20/21/22	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.

F Xn

R: 11-20/21/22-36/37/38-43

S: (2-)9-16-33-36/37

Límites de concentración.

conc. ≥ 25 %	Xn; R 20/21/22-36/37/38-43
5 % ≤ conc. < 25 %	Xi; R 36/37/38-43
1 % ≤ conc. < 5 %	Xi; R 43

Cas No 97-88-1	EEC No 202-615-1	No 607-033-00-5

NOTA D

$CH_2{=}\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}O{-}C_4H_9$

metacrilato de butilo

Clasificación.

R 10	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 10-36/37/38-43

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 96-33-3	EEC No 202-500-6	No 607-034-00-0

NOTA D

$CH_2{=}CH{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}O{-}CH_3$

acrilato de metilo

Clasificación.

F; R 11	Xn; R 20/22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

F Xn

R: 11-20/22-36/37/38

S: (2-)9-16-33

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xn; R 20/22-36/37/38
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 80-62-6	EEC No 201-297-1	No 607-035-00-6

NOTA D

$CH_2{=}\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}{-}COOCH_3$

metacrilato de metilo

Clasificación.

F; R 11	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.

F Xi

R: 11-36/37/38-43

S: (2-)9-16-29-33

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/37/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 110-49-6	EEC No 203-772-9	No 607-036-00-1

NOTA E

$CH_3 — COO — CH_2 — CH_2 — O — CH_3$

acetato de 2-metoxietilo; acetato de metilglicol

Clasificación.

Repr. Cat. 2; R 60-61	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

T

R: 60-61-20/21/22

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 111-15-9	EEC No 203-839-2	No 607-037-00-7

NOTA E

$CH_3 — COO — CH_2 — CH_2 — O — C_2H_5$

acetato de 2-etoxietilo; acetato de etilglicol

Clasificación.

Repr. Cat. 2; R 60-61	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

T

R: 60-61-20/21/22

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 112-07-2	EEC No 203-933-3	No 607-038-00-2

$CH_3 — COO — CH_2 — CH_2 — O — C_4H_9$

acetato de 2-butoxietilo; acetato de butilglicol

Clasificación.

Xn; R 20/21

Etiquetado.

Xn

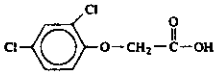
R: 20/21

S: (2-)24

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 20/21

Cas No 94-75-7	EEC No 202-361-1	No 607-039-00-8



2,4-D (ISO); ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Clasificación.

Xn; R 22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

Xn

R: 22-36/37/38

S: (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No —	EEC No —	No 607-040-00-3

NOTA A

sales y ésteres del 2,4-D

Clasificación,

Xn : R 20/21/22

Etiquetado,

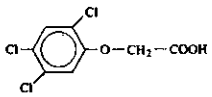
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 93-76-5	EEC No 202-273-3	No 607-041-00-9



2,4,5-T (ISO) ; ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético

Clasificación,

Xn : R 22	Xi : R 36/37/38

Etiquetado,

Xn

R : 22-36/37/38

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 607-042-00-4

NOTA A

sales y ésteres del 2,4,5-T

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

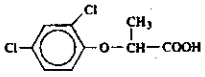
Xn

R : 22-36/37/38

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 120-36-5	EEC No 204-390-5	No 607-045-00-0



diclorprop (ISO) ; ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico

Clasificación,

Xn ; R 21/22	Xi ; R 38-41

Etiquetado,

Xn

R : 21/22-38-41

S : (2-)26-36/37

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 607-046-00-6

NOTA A

sales de diclorprop

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

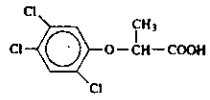
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 93-72-1	EEC No 202-271-2	No 607-047-00-1



fenoprop (ISO) ; ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 38

Etiquetado,

Xn

R : 22-38

S : (2-)37

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 607-048-00-7

NOTA A

sales de fenoprop

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

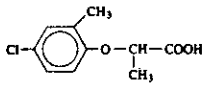
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 93-65-2	EEC No 202-264-4	No 607-049-00-2



mecoprop (ISO) ; ácido 2-(4-cloro-o-toliloxi) propiónico ; ácido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 38-41

Etiquetado,

Xn

R : 22-38-41

S : (2-)26-37/39

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 607-050-00-8

NOTA A

sales de mecoprop

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

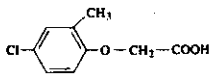
S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 94-74-6

EEC No 202-360-6

No 607-051-00-3



MCPA (ISO) ; ácido 4-cloro-o-toliloxiacético ; ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético

Clasificación,

Xn ; R 22 | Xi ; R 38-41

Etiquetado.

Xn

R : 22-38-41

S : (2-)26-37-39

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 607-052-00-9

NOTA A

sales y ésteres de MCPA

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

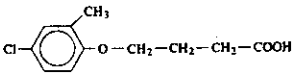
S : (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 94-81-5

EEC No 202-365-3

No 607-053-00-4



MCPB (ISO) ; ácido 4-(4-cloro-o-toliloxi) butírico

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 607-054-00-X

NOTA A

sales y ésteres de MCPB

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

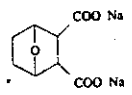
Xn

R : 22

S : (2-)24/25

Límites de concentración,

Cas No 129-67-9	EEC No 204-959-8	No 607-055-00-5



endotal-sódico (ISO) ; 7-oxabiciclo(2,2,1)heptan-2,3-dicarboxilato de disódico 3,6-epoxiciclohexano-1,2-dicarboxilato de disodico

Clasificación,

T ; R 25	Xn ; R 21	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

T

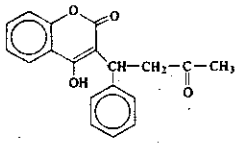
R : 21-25-36/37/38

S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 81-81-2	EEC No 201-377-6	No 607-056-00-0

NOTA E



4-hidroxi-3-(1-fenil-3-oxo-butil)-cumarina ; warfarina

Clasificación,

Repr. Cat. 1 ; R 61	T ; R 48/25

Etiquetado,

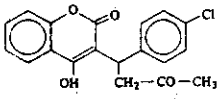
T

R : 61-48/25

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 81-82-3	EEC No 201-378-1	No 607-057-00-6



cumacloro (ISO) ; 3-(1-(4-clorofenil)-3-oxobutil)-4-hidroxicumarina

Clasificación,

Xn ; R 48/22

Etiquetado,

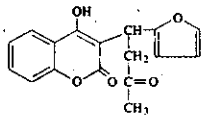
Xn

R : 48/22

S : (2-)37

Límites de concentración,

Cas No 117-52-2 | EEC No 204-195-5 | No 607-058-00-1



cumafurilo ; 3-[1-(2-furil)-3-oxo-butil]-4-hidroxicumarina

Clasificación,

T ; R 25-48/25

Etiquetado,

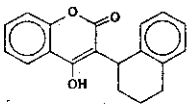
T

R : 25-48/25

S : (1/2-)37-45

Límites de concentración,

Cas No 5836-29-3 | EEC No 227-424-0 | No 607-059-00-7



cumatetralilo (ISO) ; 4-hidroxi-3-(1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil)cumarina

Clasificación,

T+ ; R 27/28 | T ; R 48/24/25

Etiquetado

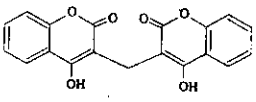
T+

R : 27/28-48/24/25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 66-76-2 | EEC No 200-632-9 | No 607-060-00-2



dicumarina ; 3,3'-metileno-bis(4-hidroxicumarina)

Clasificación,

T ; R 48/25 | Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 22-48/25

S : (1/2-)37-45

Límites de concentración,

Cas No 79-10-7 | EEC No 201-177-9 | No 607-061-00-8

NOTA D

$CH_2 = CH — COOH$

ácido acrílico

Clasificación,

R 10 | C ; R 34

Etiquetado,

C

R : 10-34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 34
2 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38

Cas No 141-32-2	EEC No 205-480-7	No 607-062-00-3

NOTA D

$CH_2 = CH — COO — C_4H_9$

acrilato de n-butilo

Clasificación

R 10	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado

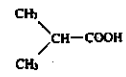
Xi

R: 10-36/37/38-43

S: (2-)9

Límites de concentración

Cas No 79-31-2	EEC No 201-195-7	No 607-063-00-9



ácido isobutírico

Clasificación

Xn; R 21/22

Etiquetado

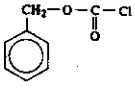
Xn

R: 21/22

S: (2)

Límites de concentración

Cas No 501-53-1	EEC No 207-925-0	No 607-064-00-4



cloroformiato de bencilo

Clasificación

C; R 34	Xi; R 37

Etiquetado

C

R: 34-37

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración

Cas No 79-08-3	EEC No 201-175-8	No 607-065-00-X

$BrCH_2 — COOH$

ácido bromoacético

Clasificación

T; R 23/24/25	C; R 35

Etiquetado

T C

R: 23/24/25-35

S: (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración

Cas No 79-43-6 | EEC No 201-207-0 | No 607-066-00-5

$Cl_2CH — COOH$

ácido dicloroacético

Clasificación.

C ; R 35

Etiquetado.

C

R : 35

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración.

Cas No 79-36-7 | EEC No 201-199-9 | No 607-067-00-0

$Cl_2CH — COCl$

cloruro de dicloroacetilo

Clasificación.

C ; R 35

Etiquetado.

C

R : 35

S : (1/2-)9-26-45

Límites de concentración.

Cas No 64-69-7 | EEC No 200-590-1 | No 607-068-00-6

$ICH_2 — COOH$

ácido yodoacético

Clasificación.

T ; R 25 | C ; R 35

Etiquetado.

T C

R : 25-35

S : (1/2-)22-36/37/39-45

Límites de concentración.

Cas No 105-36-2 | EEC No 203-290-9 | No 607-069-00-1

$BrCH_2 — COO — C_2H_5$

bromoacetato de etilo

Clasificación.

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado.

T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)7/9-26-45

Límites de concentración.

Cas No 105-39-5 | EEC No 203-294-0 | No 607-070-00-7

$ClCH_2COO-C_2H_5$

cloroacetato de etilo

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)7/9-45

Límites de concentración.

Cas No [illegible]-63-2 | EEC No 202-597-5 | No 607-071-00-2

NOTA D

$CH_2=C(CH_3)-COO-C_2H_5$

metacrilato de etilo

Clasificación.

F; R 11	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.

F Xi

R: 11-36/37/38-43

S: (2-)9-16-29-33

Límites de concentración.

Cas No 818-61-1 | EEC No 212-454-9 | No 607-072-00-8

NOTA D

$CH_2=CH-COO-CH_2-CH_2OH$

acrilato de 2-hidroxietilo

Clasificación.

T; R 24	C; R 34	R 43

Etiquetado.

T

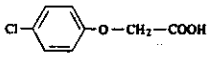
R: 24-34-43

S: (1/2-)26-36/39-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	T; R 24-34-43
5 % ≤ C < 10 %	T; R 24-36/38-43
2 % ≤ C < 5 %	T; R 24-43
0,2 % ≤ C < 2 %	Xn; R 21-43

Cas No 122-88-3 | EEC No 204-581-3 | No 607-073-00-3



4-CPA; acido 4-clorofenoxiacético

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

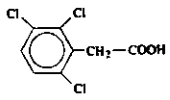
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 85-34-7 | EEC No 201-599-3 | No 607-074-00-9



chlorfenac (ISO); ácido 2,3,6-triclorofenilacético

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

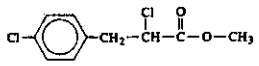
Xn

R: 22

S: (2-)36

Límites de concentración.

Cas No 14437-17-3 | EEC No 238-413-5 | No 607-075-00-4



chlorfenprop-metilo (ISO); 2-cloro-3-(4-clorofenil) propionato de metilo

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

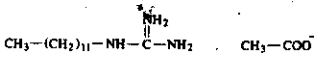
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 2439-10-3 | EEC No 219-459-5 | No 607-076-00-X



dodina (ISO); acetato de dodecilguanidinio

Clasificación.

Xn; R 22 | Xi; R 36/38

Etiquetado.

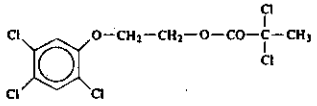
Xn

R: 22-36/38

S: (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 136-25-4 | EEC No — | No 607-077-00-5



erbon (ISO); 2,2-dicloropropionato de 2-(2,4,5-triclorofenoxi)etilo

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

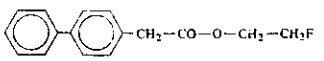
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 4301-50-2 | EEC No — | No 607-078-00-0



fluenetil (ISO); bifenil-4-ilacetato de 2-fluoroetilo

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

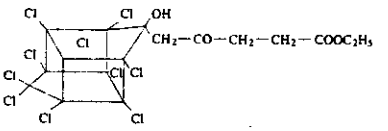
T+

R : 27/28

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 4234-79-1 | EEC No — | No 607-079-00-6



celevano (ISO); 5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decacloro-4-hidroxipentaciclo(5,2,1,0^{2,6},0^{3,9},0^{5,8}) dec-4-il)-4-oxovalerato de etilo

Clasificación,

T; R 24 | Xn; R 22

Etiquetado,

T

R : 22-24

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 79-04-9 | EEC No 201-171-6 | No 607-080-00-1

$CH_2Cl-COCl$

cloruro de cloroacetilo; monocloroacetilo

Clasificación,

C; R 34 | Xi; R 37

Etiquetado,

C

R : 34-37

S : (1/2-)9-26-45

Límites de concentración,

Cas No 144-49-0 | EEC No 205-631-7 | No 607-081-00-7

FCH_2-COOH

ácido fluoroacético; ácido monofluoroacético

Clasificación,

T+ ; R 28

Etiquetado,

T+

R : 28

S : (1/2-)20-22-26-45

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 607-082-00-2

NOTA A

$[FCH_2-COO]_x M_y$

fluoroacetatos solubles; monofluoroacetatos solubles

Clasificación,

T+; R 28

Etiquetado,

T+

R: 28

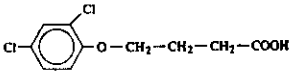
S: (1/2-)20-22-26-45

Límites de concentración,

Cas No 94-82-6

EEC No 202-366-9

No 607-083-00-8



ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico; 2,4-DB

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 607-084-00-3

NOTA A

sales de 2,4-DB

Clasificación,

Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R: 20/21/22

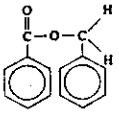
S: (2-)13

Límites de concentración,

Cas No 120-51-4

EEC No 204-402-9

No 607-085-00-9



benzoato de bencilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

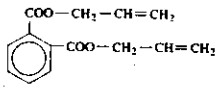
Xn

R: 22

S: (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 131-17-9 | EEC No 205-016-3 | No 607-086-00-4



ftalato de dialilo

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

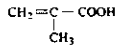
S : (2-)24/25

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 22

Cas No 79-41-4 | EEC No 201-204-4 | No 607-088-00-5

NOTA D



ácido 2-metilpropenoico ; ácido metacrílico

Clasificación.

C ; R 34

Etiquetado.

C

R : 34

S : (1/2-)15-26-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	C ; R 34
2 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38

Cas No 79-09-4 | EEC No 201-176-3 | No 607-089-00-0

NOTA B

$CH_3 - CH_2 - COOH$ ... %

ácido propiónico ... %

Clasificación.

C ; R 34

Etiquetado.

C

R : 34

S : (1/2-)23-36-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	C ; R 34
10 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 68-11-1 | EEC No 200-677-4 | No 607-090-00-6

$HS - CH_2 - COOH$

ácido tioglicólico ; ácido mercaptoacético

Clasificación.

T ; R 23/24/25 | C ; R 34

Etiquetado.

T

R : 23/24/25-34

S : (1/2-)25-27-28-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	T ; R 23/24/25-34
5 % ≤ C < 10 %	T ; R 23/24/25-36/38
2 % ≤ C < 5 %	T ; R 23/24/25
0,2 % ≤ C < 2 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 76-05-1 | EEC No 200-929-3 | No 607-091-00-1

NOTA B

$CF_3 - COOH$ ... %

ácido trifluoroacético ... %

Clasificación,

Xn ; R 20	C ; R 35

Etiquetado,

C

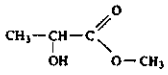
R : 20-35

S : (1/2-)9-26-27-28-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	C ; R 20-35
5 % ≤ C < 10 %	C ; R 34
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 36/38

Cas No 547-64-8 | EEC No 208-930-0 | No 607-092-00-7



lactato de metilo

Clasificación,

R 10

Etiquetado,

R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 79-03-8 | EEC No 201-170-0 | No 607-093-00-2

$CH_3 - CH_2 - COCl$

cloruro de propionilo

Clasificación,

F ; R 11	R 14	C ; R 34

Etiquetado,

F C

R : 11-14-34

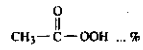
S : (1/2-)9-16-26-45

Límites de concentración,

Cas No 79-21-0 | EEC No 201-186-8 | No 607-094-00-8

NOTA B

NOTA D



ácido peracético ... %

Clasificación,

R 10	O ; R 7	Xn ; R 20/21/22	C ; R 35

Etiquetado,

O C

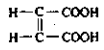
R : 7-10-20/21/22-35

S : (1/2-)3/7-14-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	C ; R 20/21/22-35
5 % ≤ C < 10 %	C ; R 34
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 110-16-7 | EEC No 203-742-5 | No 607-095-00-3



ácido maleico

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

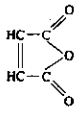
Xn

R : 22-36/37/38

S : (2-)26-28-37

Límites de concentración,

Cas No 108-31-6 | EEC No 203-571-6 | No 607-096-00-9



anhídrido maleico

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38	R 42

Etiquetado,

Xn

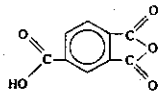
R : 22-36/37/38-42

S : (2-)22-28-39

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 22-36/37/38-42
10 % ≤ C < 25 %	Xn ; R 36/37/38-42
1 % ≤ C < 10 %	Xn ; R 42

Cas No 552-30-7 | EEC No 209-008-0 | No 607-097-00-4



1,2-anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico ; anhídrido trimelítico

Clasificación,

Xi ; R 36/37/38	R 42

Etiquetado,

Xn

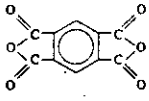
R : 36/37/38-42

S : (2-)22-28

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xn ; R 36/37/38-42
0,3% ≤ C < 10 %	Xn ; R 42

Cas No 89-32-7 | EEC No 201-898-9 | No 607-098-00-X



dianhídrido 1,2 :4,5-bencenotetracarboxílico ; dianhídrido piromelítico

Clasificación,

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

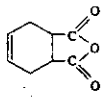
R : 36/37/38

S : (2-)25

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 85-43-8 | EEC No 201-605-4 | No 607-099-00-5



anhidrido 4-ciclohexeno-1,2-dicarboxílico; anhídrido tetrahidroftálico

Clasificación.

Xi; R 36/37

Etiquetado.

Xi

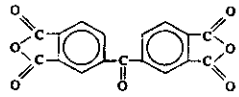
R: 36/37

S: (2-)25

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	Xi; R 36/37

Cas No 2421-28-5 | EEC No 219-348-1 | No 607-100-00-9



dianhídrido 3,3',4,4'-benzofenonatetracarboxílico

Clasificación.

Xi; R 36/37

Etiquetado.

Xi

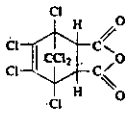
R: 36/37

S: (2-)25

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	Xi; R 36/37

Cas No 115-27-5 | EEC No 204-077-3 | No 607-101-00-4



anhídrido 1,4,5,6,7,7-hexaclorobiciclo [2,2,1]-5-hepten-2,3-dicarboxílico; anhídrido cloréndico

Clasificación.

Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

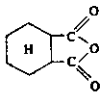
R: 36/37/38

S: (2-)25

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 85-42-7 | EEC No 201-604-9 | No 607-102-00-X



anhídrido 1,2-ciclohexanodicarboxílico; anhídrido hexahidroftálico

Clasificación.

Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

R: 36/37/38

S: (2-)23-39

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 108-30-5 | EEC No 203-570-0 | No 607-103-00-5

anhídrido succínico

Clasificación,

Xi ; R 36/37

Etiquetado,

Xi

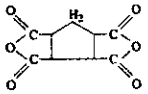
R : 36/37

S : (2-)25

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xi ; R 36/37

Cas No 6053-68-5 | EEC No 227-964-7 | No 607-104-00-0



dianhídrido 1,2:3,4-ciclopentanotetracarboxílico

Clasificación,

Xi ; R 36/37

Etiquetado,

Xi

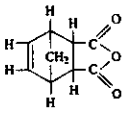
R : 36/37

S : (2-)25

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xi ; R 36/37

Cas No 129-64-6 | EEC No 204-957-7 | No 607-105-00-6



anhídrido 5-norborneno-2,3-dicarboxílico

Clasificación,

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

R : 36/37/38

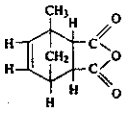
S : (2-)39

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 123748-85-6 | EEC No — | No 607-106-00-1

NOTA C



anhídrido 1-metil-5-norborneno-2,3-dicarboxílico

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38	R 42

Etiquetado,

Xn

R : 22-36/37/38-42

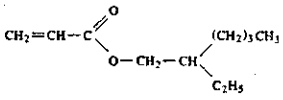
S : (2-)39

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn ; R 22-36/37/38-42
10 % ≤ C < 25 %	Xn ; R 36/37/38-42
1 % ≤ C < 10 %	Xn ; R 42

Cas No 103-11-7	EEC No 203-080-7	No 607-107-00-7

NOTA D



acrilato de 2-etilhexilo

Clasificación.

Xi; R 37/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 37/38-43

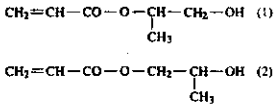
S: (2-)24-37

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 37/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 2918-23-2 (1) 999-61-1 (2) 25584-83-2 (mix)	EEC No 220-852-9 (1) 213-663-8 (2) 247-118-0 (mix)	No 607-108-00-2

NOTA C
NOTA D



acrilato de hidroxipropilo

Clasificación.

T; R 23/24/25	C; R 34	R 43

Etiquetado.

T

R: 23/24/25-34-43

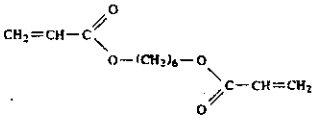
S: (2-)26-36/39-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	T; R 23/24/25-34-43
5 % ≤ C < 10 %	T; R 23/24/25-36/38-43
2 % ≤ C < 5 %	T; R 23/24/25-43
0,2 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20/21/22-43

Cas No 13048-33-4	EEC No 235-921-9	No 607-109-00-8

NOTA D



diacrilato de hexametileno; diacrilato de hexano-1,6-diol

Clasificación.

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 36/38-43

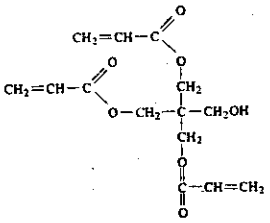
S: (2-)39

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 3524-68-3	EEC No 222-540-8	No 607-110-00-3

NOTA D



triacrilato de pentaeritritol

Clasificación.

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 36/38-43

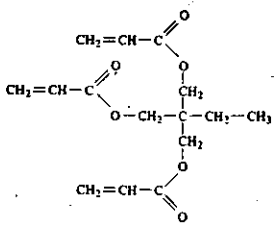
S: (2-)39

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 15625-89-5 | EEC No 239-701-3 | No 607-111-00-9

NOTA D



acrilato de 2-2-bis(acriloximetil)butilo; triacrilato de trimetilolpropano

Clasificación.

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 36/38-43

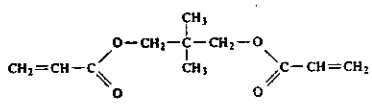
S: (2-)39

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 2223-82-7 | EEC No 218-741-5 | No 607-112-00-4

NOTA D



diacrilato de 2,2-dimetil-1,3-propanodiilo; diacrilato de neopentilglicol

Clasificación.

T; R 24	Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

T

R: 24-36/38-43

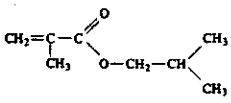
S: (1/2-)28-39-45

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	T; R 24-36/38-43
5 % ≤ C < 20 %	T; R 24-43
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 21-43
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn; R 21

Cas No 97-86-9 | EEC No 202-613-0 | No 607-113-00-X

NOTA D



metacrilato de isobutilo

Clasificación.

R 10	Xi; R 36/37/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 10-36/37/38-43

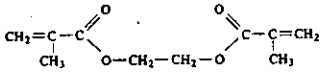
S: (2-)24-37

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/37/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 97-90-5 | EEC No 202-617-2 | No 607-114-00-5

NOTA D



dimetacrilato de etileno; dimetacrilato de etilenglicol

Clasificación.

Xi; R 36/37

Etiquetado.

Xi

R: 36/37

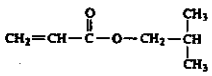
S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 36/37

Cas No 106-63-8	EEC No 203-417-8	No 607-115-00-0

NOTA D



acrilato de isobutilo

Clasificación.

R 10	Xn; R 20/21	Xi; R 38	R 43

Etiquetado.

Xn

R: 10-20/21-38-43

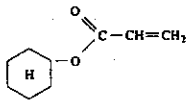
S: (2-)9-24-37

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 20/21-38-43
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 38-43
1 % ≤ C < 10 %	Xi; R 43

Cas No 3066-71-5	EEC No 221-319-3	No 607-116-00-6

NOTA D



acrilato de ciclohexilo

Clasificación.

Xi; R 37/38

Etiquetado.

Xi

R: 37/38

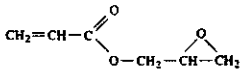
S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 37/38

Cas No 106-90-1	EEC No 203-440-3	No 607-117-00-1

NOTA D



acrilato de 2,3-epoxipropilo; acrilato de glicidilo

Clasificación.

T; R 23/24/25	C; R 34	R 43

Etiquetado.

T

R: 23/24/25-34-43

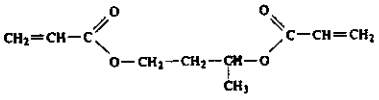
S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	T; R 23/24/25-34-43
5 % ≤ C < 10 %	T; R 23/24/25-36/38-43
2 % ≤ C < 5 %	T; R 23/24/25-43
0,2 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20/21/22-43

Cas No 19485-03-1	EEC No 243-105-9	No 607-118-00-7

NOTA D



diacrilato de 1-metiltrimetileno; diacrilato de 1,3-butilenglicol

Clasificación.

Xn; R 21	C; R 34	R 43

Etiquetado.

C

R: 21-34-43

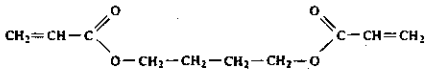
S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	C; R 21-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi; R 43

Cas No 1070-70-8	EEC No 213-979-6	No 607-119-00-2

NOTA D



diacrilato de 1,4-tetrametileno; diacrilato de 1,4-butilenglicol

Clasificación,

Xn; R 21	C; R 34	R 43

Etiquetado,

C

R: 21-34-43

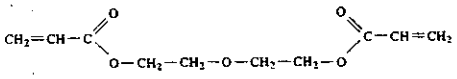
S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 21-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi; R 43

Cas No 4074-88-8	EEC No 223-791-6	No 607-120-00-8

NOTA D



diacrilato de 2,2'-oxidietilo; diacrilato de dietilenglicol

Clasificación,

T; R 24	Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado,

T

R: 24-36/38-43

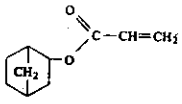
S: (1/2-)28-39-45

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T; R 24-36/38-43
2 % ≤ C < 20 %	T; R 24-43
0,2 % ≤ C < 2 %	Xn; R 21-43

Cas No 10027-06-2	EEC No —	No 607-121-00-3

NOTA D



acrilato de 2-norbornilo

Clasificación,

Xn; R 21	Xi; R 38	R 43

Etiquetado,

Xn

R: 21-38-43

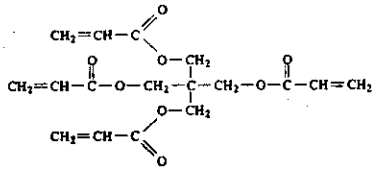
S: (2-)28

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 21-38-43
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 38-43
1 % ≤ C < 10 %	Xi; R 43

Cas No 4986-89-4	EEC No 225-644-1	No 607-122-00-9

NOTA D



tetracrilato de pentaeritritol

Clasificación,

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado,

Xi

R: 36/38-43

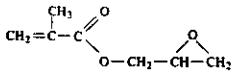
S: (2-)26-39

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 106-91-2	EEC No 203-441-9	No 607-123-00-4

NOTA D



metacrilato de 2,3-epoxipropilo; metacrilato de glicidilo

Clasificación.

Xn; R 20/21/22	Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xn

R: 20/21/22-36/38-43

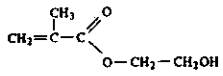
S: (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn; R 20/21/22-36/38-43
10 % ≤ C < 25 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 10 %	Xi; R 43

Cas No 868-[illegible]-9	EEC No 212-782-2	No 607-124-00-X

NOTA D



metacrilato de 2-hidroxietilo

Clasificación.

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 36/38-43

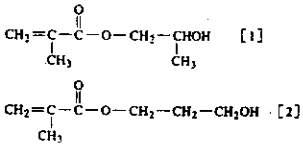
S: (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 923-26-2 [1] 2761-09-3 [2]	EEC No 213-090-3 [1] 220-426-2 [2]	No 607-125-00-5

NOTA D



metacrilato de hidroxipropilo, mezcla de [1] y [2]

Clasificación.

Xi; R 36/38

Etiquetado.

Xi

R: 36/38

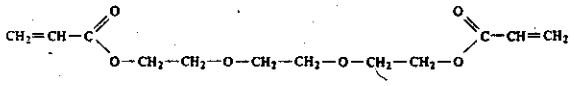
S: (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 1680-21-3	EEC No 216-853-9	No 607-126-00-0

NOTA D



diacrilato de 2,2'-(etilendioxi)dietilo; diacrilato de trietilenglicol

Clasificación.

Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

R: 36/38-43

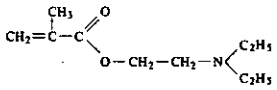
S: (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi; R 43

Cas No 105-16-8	EEC No 203-275-7	No 607-127-00-6

NOTA D



metacrilato de 2-dietilaminoetilo

Clasificación.

Xn ; R 20	Xi ; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xn

R : 20-36/38-43

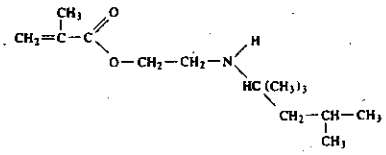
S : (2-)26

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 20-36/38-43
10 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 43

Cas No 3[illegible]5-90-4	EEC No 223-228-4	No 607-128-00-1

NOTA D



metacrilato de 2-terc-butilaminoetilo

Clasificación.

Xi ; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xi

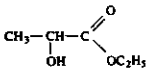
R : 36/38-43

S : (2-)26

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 20 %	Xi ; R 43

Cas No 97-64-3	EEC No 202-598-0	No 607-129-00-7



lactato de etilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

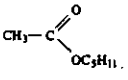
R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración.

Cas No 628-63-7	EEC No 211-047-3	No 607-130-00-2

NOTA C



acetato de pentilo ; acetato de amilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

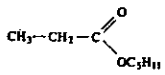
R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración.

Cas No 624-54-4	EEC No 210-852-7	No 607-131-00-8

NOTA C



propionato de pentilo; propionato de amilo

Clasificación.

R 10

Etiquetado.

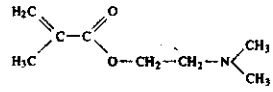
R : 10

S : (2-)23

Límites de concentración.

Cas No 2867-47-2	EEC No 220-688-8	No 607-132-00-3

NOTA D



metacrilato de 2-dimetilaminoetilo

Clasificación.

Xn ; R 21/22	Xi ; R 36/38	R 43

Etiquetado.

Xn

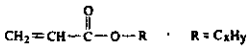
R : 21/22-36/38-43

S . (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 21/22-36/38-43
10 % ≤ C < 25 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 43

Cas No —	EEC No —	No 607-133-00-9



acrilatos excepto de los especialemente citados en este Anexo

Clasificación.

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

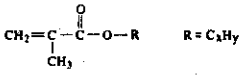
R : 36/37/38

S : (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No —	EEC No —	No 607-134-00-4



metacrilatos, excepto de los especialmente citados en este Anexo

Clasificación.

Xi ; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

R : 36/37/38

S : (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xi ; R 36/37/38

Cas No 107-92-6 | EEC No 203-532-3 | No 607-135-00-X

$$CH_3-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH$$

ácido butírico

Clasificación.

C; R 34

Etiquetado.

C

R: 34

S: (1/2-)26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 141-75-3 | EEC No 205-498-5 | No 607-136-00-5

$$CH_3-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-Cl$$

cloruro de butirilo

Clasificación.

F; R 11	C; R 34

Etiquetado.

F C

R: 11-34

S: (1/2-)16-23-26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 105-45-3 | EEC No 203-299-8 | No 607-137-00-0

$$CH_3-CO-CH_2-COO-CH_3$$

acetoacetato de metilo

Clasificación.

Xi; R 36

Etiquetado.

Xi

R: 36

S: (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 592-34-7 | EEC No 209-750-5 | No 607-138-00-6

$$CH_3-(CH_2)_3-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-Cl$$

cloroformiato de butilo; ester butílico del ácido clorofórmico

Clasificación.

R 10	T; R 23	C; R 34

Etiquetado.

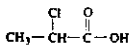
T

R: 10-23-34

S: (1/2-)26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 598-78-7 | EEC No 209-952-3 | No 607-139-00-1



ácido 2-cloropropiónico

Clasificación.

Xn ; R 22	C ; R 35

Etiquetado.

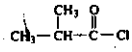
C

R : 22-35

S : (1/2-)23-26-28-36-45

Límites de concentración.

Cas No 79-30-1 | EEC No 201-194-1 | No 607-140-00-7



cloruro de isobutirilo

Clasificación.

F ; R 11	C ; R 35

Etiquetado.

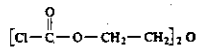
F C

R : 11-35

S : (1/2-)16-23-26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 106-75-2 | EEC No 203-430-9 | No 607-141-00-2



bis (cloroformiato) de oxidietileno

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 38-41

Etiquetado.

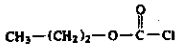
Xn

R : 22-38-41

S : (2-)23-26

Límites de concentración.

Cas No 109-61-5 | EEC No 203-687-7 | No 607-142-00-8



cloroformiato de n-propilo

Clasificación.

R 10	T ; R 23	C ; R 34

Etiquetado.

T

R : 10-23-34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 109-52-4 | EEC No 203-677-2 | No 607-143-00-3

$$CH_3-(CH_2)_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OH$$

ácido valérico

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R : 34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 124-04-9 | EEC No 204-673-3 | No 607-144-00-9

$$HOOC-(CH_2)_4-COOH$$

ácido adípico

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R : 36

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 75-75-2 | EEC No 200-898-6 | No 607-145-00-4

$$CH_3-SO_2-OH$$

ácido metanosulfónico

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

C

R : 34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 110-17-8 | EEC No 203-743-0 | No 607-146-00-X

$$\begin{array}{c} HOOCCH \\ \| \\ HCCOOH \end{array}$$

ácido fumárico

Clasificación,

Xi; R 36

Etiquetado,

Xi

R : 36

S : (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 95-92-1 | EEC No 202-464-1 | No 607-147-00-5

$COOC_2H_5$
|
$COOC_2H_5$

oxalato de dietilo; éster dietílico del ácido oxálico

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36

Etiquetado,

Xn

R: 22-36

S: (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 50-01-1 | EEC No 200-002-3 | No 607-148-00-0

$[H_2N-C(=NH)-NH_2].HCl$

cloruro de guanidinio

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/38

Etiquetado,

Xn

R: 22-36/38

S: (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 51-79-6 | EEC No 200-123-1 | No 607-149-00-6

$NH_2COOC_2H_5$

uretano (DCI); carbamato de etilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado,

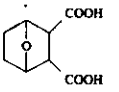
T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 145-73-3 | EEC No 205-660-5 | No 607-150-00-1



endotal; ácido 7-oxabiciclo(2,2,1)heptano-2,3-dicarboxílico

Clasificación,

T; R 25	Xn; R 21	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

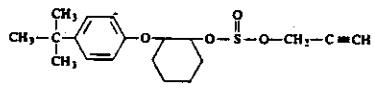
T

R: 21-25-36/37/38

S: (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 2312-35-8 | EEC No 219-006-1 | No 607-151-00-7



propargita (ISO); sulfito de 2-(4-terc-butilfenoxi)ciclohexilo y de prop-2-inilo

Clasificación.

Xn; R 22 | Xi; R 36

Etiquetado.

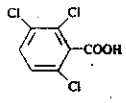
Xn

R: 22-36

S: (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 50-31-7 | EEC No 200-026-4 | No 607-152-00-2



2,3,6-TBA (ISO); ácido 2,3,6-triclorobenzoico

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

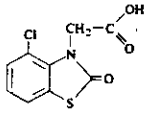
Xn

R: 22

S: (2-)22

Límites de concentración.

Cas No 3813-05-6 | EEC No 223-297-0 | No 607-153-00-8



benzolina (ISO); ácido 4-cloro-2-oxobenzotiazolin-3-ilacético

Clasificación.

Xi; R 36/38

Etiquetado.

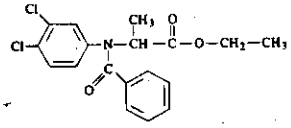
Xi

R: 36/38

S: (2-)22

Límites de concentración

Cas No 33878-50-1 | EEC No — | No 607-154-00-3



benzoilprop-etil (ISO); N-benzoil-N-(3,4-diclorofenil)-DL-alaninato de etilo

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

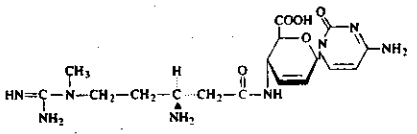
Xn

R: 22

S: (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 2079-00-7 | EEC No — | No 607-155-00-9



ácido 3-(3-amino-5-(1-metilguanidino)-1-oxopentilamino-6-(4-amino-2-oxo-2,3-dihidro-pirimidin-1-il)-2,3-dihidro-2(6H)-pirano-2-carboxílico; blasticidin-s

Clasificación.

T+; R 28

Etiquetado.

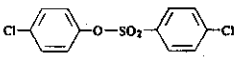
T+

R: 28

S: (1/2-)24/25-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 80-33-1 | EEC No 201-270-4 | No 607-156-00-4



clorfenson (ISO); 4-clorobencenosulfonato de 4-clorofenilo

Clasificación.

Xn; R 22 | Xi; R 38

Etiquetado.

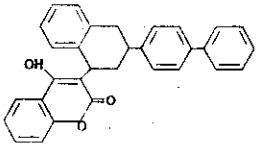
Xn

R: 22-38

S: (2-)37

Límites de concentración.

Cas No 56073-07-5 | EEC No 259-978-4 | No 607-157-00-X



3-(3-bifenil-4-il-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil)-4-hidroxicumarina; difenacum

Clasificación.

T+; R 28 | T; R 48/25

Etiquetado.

T+

R: 28-48/25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 3926-62-3 | EEC No 223-498-3 | No 607-158-00-5

$ClCH_2—COONa$

sal de sodio del ácido cloroacético; cloroacetato de sodio

Clasificación.

T; R 25 | Xi; R 38

Etiquetado.

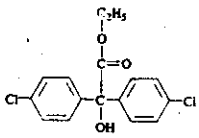
T

R: 25-38

S: (1/2-)22-37-45

Límites de concentración.

Cas No 510-15-6 | EEC No 208-110-2 | No 607-159-00-0



clorobencilato (ISO) ; 4,4'-diclorobencilato de etilo

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

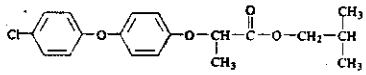
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 51337-71-4 | EEC No — | No 607-160-00-6



2-(4-(4-clorofenoxi)phenoxi)propionate de isobutilo

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

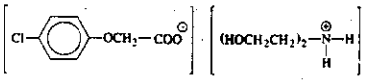
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 607-161-00-1



sal de dietanolamina de 4-CPA

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 75-99-0 | EEC No 200-923-0 | No 607-162-00-7

$CH_3 - CCl_2 - COOH$

ácido 2,2-dicloropropiónico ; dalapon

Clasificación.

Xn : R 22 | Xi ; R 38-41

Etiquetado.

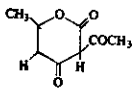
Xn

R : 22-38-41

S : (2)-26-39

Límites de concentración.

Cas No 520-45-6 | EEC No 208-293-9 | No 607-163-00-2



3-acetil-6-metil-2H-piranno-2,4(3H)-diona; ácido dehidroacético

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

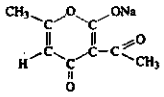
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 4418-26-2 | EEC No 224-580-1 | No 607-164-00-8



1-(3,4-dihidro-6-metil-2,4-dioxo-2H-piran-3-ilideno)etanolato de sodio; dehidracetato sódico

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

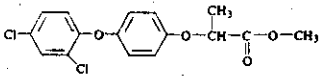
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 51338-27-3 | EEC No 257-141-8 | No 607-165-00-3



2-(4-(2,4-diclorofenoxi)fenoxi)propionato de metilo; diclofop-metil (ISO)

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

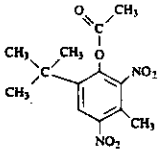
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 2487-01-6 | EEC No 219-634-6 | No 607-166-00-9



acetato de medinoterb (ISO); acetato de 6-terc-butil-3-metil-2,4-dinitrofenilo

Clasificación.

T; R 25 | Xn; R 21

Etiquetado.

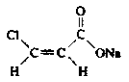
T

R: 21-25

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 4312-97-4 | EEC No — | No 607-167-00-4



3-cloroacrilato de sodio

Clasificación.

Xn ; R 21/22

Etiquetado.

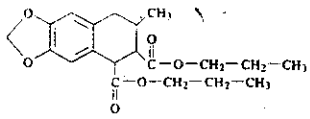
Xn

R : 21/22

S : (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 83-59-0 | EEC No — | No 607-168-00-X



6,7-metilendioxi-1,2,3,4-tetrahidro-3-metilnaftaleno-1,2-dicarboxilato de dipropilo

Clasificación.

T ; R 24 | Xn ; R 22

Etiquetado.

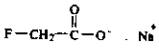
T

R : 22-24

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 62-74-8 | EEC No 200-548-2 | No 607-169-00-5



fluoroacetato de sodio

Clasificación.

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado.

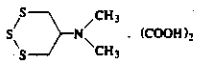
T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)13-22-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 31895-22-4 | EEC No 250-859-2 | No 607-170-00-0



oxalato de bis(1,2,3-tritiaciclohexildimetilamonio) ; tiociclam-oxalato

Clasificación.

Xn ; R 21/22

Etiquetado.

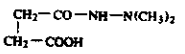
Xn

R : 21/22

S : (2-)36/37-46

Límites de concentración.

Cas No 1596-84-5 | EEC No 216-485-9 | No 607-171-00-6



daminozida

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

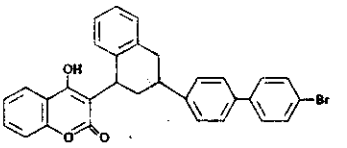
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 56073-10-0 | EEC No 259-980-5 | No 607-172-00-1



4-hidroxi-3-(3-(4'-bromo-4-bifenilil)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil)cumarina ; brodifacoum

Clasificación,

T+ ; R 27/28 | T ; R 48/24/25

Etiquetado,

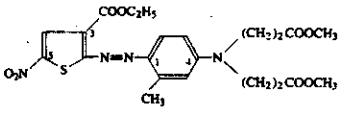
T+

R : 27/28-48/24/25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 400-460-6 | No 607-173-00-7



(3-metil-4-(5-nitro-3-etoxicarbonil-2-tienil)azo)fenilnitrilodipropionato de dimetilo

Clasificación,

R 43 | R 52-53

Etiquetado,

Xi

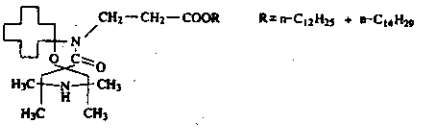
R : 43-52/53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 85099-51-0 y 85099-50-9 | EEC No 400-580-9 | No 607-174-00-2

Mezcla de,



3-(2,2,4,4-tetrametil-21-oxo-7-oxa-3,20-diazadiespiro(5,1,11,2)henicosan-20-il)propionato de dodecilo

y

3-(2,2,4,4-tetrametil-21-oxo-7-oxa-3,20-diazadiespiro(5,1,11,2)henicosan-20-il)propionato de tetradecilo

Clasificación,

Xi ; R 38 | N ; R 51-53

Etiquetado,

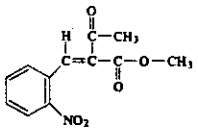
Xi N

R : 38-51/53

S : (2-)28-61

Límites de concentración,

Cas No 39562-27-1	EEC No 400-650-9	No 607-175-00-8



2-(2-nitrobenciliden)acetoacetato de metilo

Clasificación.

R 43	N; R 51-53

Etiquetado.

Xi N

R : 43-51/53

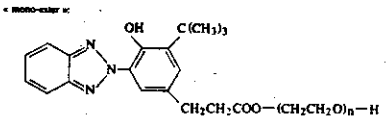
S : (2-)24-37-61

Límites de concentración.

Cas No —	EEC No 400-830-7	No 607-176-00-3

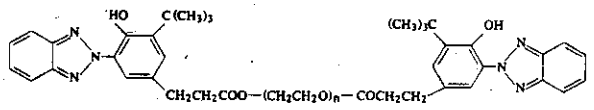
Mezcla de.

« mono-éster »:



alfa-3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil-omega-hidroxipoli(oxietileno)

« di-éster »:



alfa-3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil-omega-3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propioniloxipoli(oxietileno)

Clasificación.

Xn ; R 48/22	R 43	N ; R 51-53

Etiquetado.

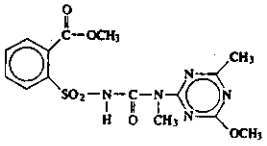
Xn N

R : 43-48/22-51/53

S : (2-)36/37-61

Límites de concentración.

Cas No 101200-48-0	EEC No 401-190-1	No 607-177-00-9



2-(3-(6-metil-4-metoxi-1,3,5-triazin-2-il)3-metilureidosulfonil)benzoato de metilo

Clasificación.

R 43

Etiquetado.

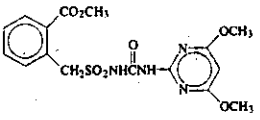
Xi

R : 43

S : (2-)22-24-37

Límites de concentración.

Cas No 83055-99-6	EEC No 401-340-6	No 607-178-00-4



alfa-((4,6-dimetoxipirimidin-2-il)ureidosulfonil)-o-tolusto de metilo

Clasificación.

R 43	N ; R 51-53

Etiquetado.

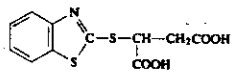
Xi N

R : 43-51/53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración.

Cas No 95154-01-1 | EEC No 401-450-4 | No 607-179-00-X



ácido (benzotiazol-2-iltio)succínico

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

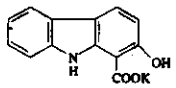
Xi

R : 43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 96566-70-0 | EEC No 401-630-2 | No 607-180-00-5



2-hidroxicarbazol-1-carboxilato de potasio

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36/37	R 52-53

Etiquetado,

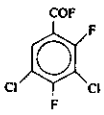
Xn

R : 22-36/37-52/53

S : (2-)22-26-61

Límites de concentración,

Cas No 101513-70-6 | EEC No 401-800-6 | No 607-181-00-0



fluoruro de 3,5-dicloro-2,4-difluorobenzoilo

Clasificación,

T ; R 23	C ; R 34	Xn ; R 22	R 29	R 43	R 52-53

Etiquetado,

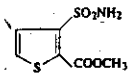
T C

R : 22-23-29-34-43-52/53

S : (1/2-)26-36/37/39-45-61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 402-050-2 | No 607-182-00-6



3-sulfamoil-2-tenoato de metilo

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

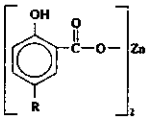
S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 402-280-3

No 607-183-00-1



R = C_{13-18} lineal alquil

2-hidroxi-5-C13-18-alquilbenzoato de zinc

Clasificación,

Xi ; R 36/38	N ; R 51-53

Etiquetado,

Xi N

R : 36/38-51/53

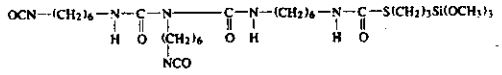
S : (2-)26-61

Límites de concentración,

Cas No 85702-90-5

EEC No 402-290-8

No 607-184-00-7



19-isocianato-11-(6-isocianatohexil)-10,12-dioxo-2,9,11,13-tetraazanonadecantioato de S-(3-trimetoxisilil)propilo

Clasificación,

R 10	R 42/43

Etiquetado,

Xn

R : 10-42/43

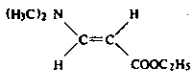
S : (2-)23-24-37

Límites de concentración,

Cas No 924-99-2

EEC No 402-650-4

No 607-185-00-2



trans-3-dimetilaminoacrilato de etilo

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

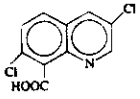
S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 84087-01-4

EEC No 402-780-1

No 607-186-00-8



ácido 3,7-dicloroquinolina-8-carboxílico

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

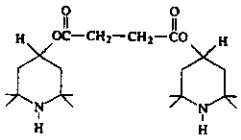
Xi

R : 43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 62782-03-0	EEC No 402-940-0	No 607-187-00-3



succinato de bis(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidilo)

Clasificación,

Xi ; R 36	R 52-53

Etiquetado,

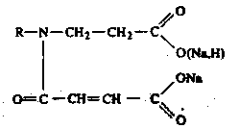
Xi

R : 36-52/53

S : (2-)26-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 402-970-4	No 607-188-00-9



R = $C_{18}H_{35}$-

N-carboxilatoetil-N-octadec-9-enilmaleamato de hidrogeno y sodio

Clasificación,

R 43	R 52-53.

Etiquetado,

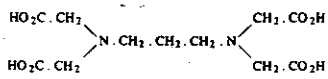
Xi

R : 43-52/53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 1939-36-2	EEC No 400-400-9	No 607-189-00-4



ácido trimetilendiamintetraacético

Clasificación,

Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado,

Xn

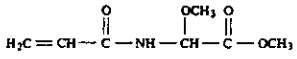
R : 22-36

S : (2-)22-26

Límites de concentración,

Cas No 77402-03-0	EEC No 401-890-7	No 607-190-00-X

NOTA E



acrilamidometoxiacetato de metilo (conteniendo ≥ 0,1 % de acrilamida)

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Muta. Cat. 2 ; R 46	Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado,

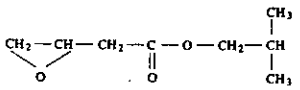
T

R : 45-46-22-36

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 100181-71-3 | EEC No 401-920-9 | No 607-191-00-5

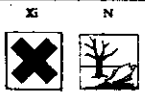


3,4-epoxibutirato de isobutilo

Clasificación.

Xi ; R 38	R 43	N ; R 50-53

Etiquetado.



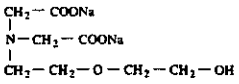
Xi N

R : 38-43-50/53

S : (2-)24-28-36/37-60-61

Límites de concentración.

Cas No 92511-22-3 | EEC No 402-360-8 | No 607-192-00-0



N-carboximetil-N-(2-(2-hidroxietoxi)etil)glicinato de disodio

Clasificación.

Xi : R 41

Etiquetado.

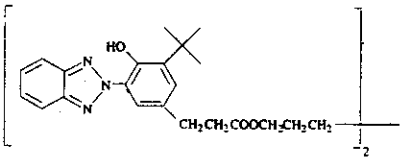
Xi

R : 41

S : (2-)26-39

Límites de concentración.

Cas No 84268-08-6 | EEC No 402-930-6 | No 607-193-00-6



bis(3-(3-benzotriazol-2-il-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionato) de hexan-1,6-diilo

Clasificación.

R 53

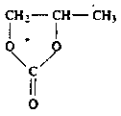
Etiquetado.

R : 53

S : 61

Límites de concentración.

Cas No 108-32-7 | EEC No 203-572-1 | No 607-194-00-1

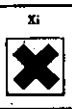


carbonato de propileno

Clasificación.

Xi ; R 36

Etiquetado.



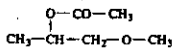
Xi

R : 36

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 108-65-6 | EEC No 203-603-9 | No 607-195-00-7



acetato de 1-metil-2-metoxietilo

Clasificación,

R 10	Xi ; R 36

Etiquetado,

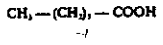
Xi

R : 10-36

S : (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 111-14-8 | EEC No 203-838-7 | No 607-196-00-2



ácido heptanoico

Clasificación,

C ; R 34

Etiquetado,

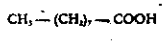
C

R : 34

S : (1/2-)26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 112-05-0 | EEC No 203-931-2 | No 607-197-00-8



ácido nonanoico

Clasificación,

C ; R 34

Etiquetado,

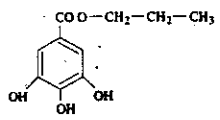
C

R : 34

S : (1/2-)26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 121-79-9 | EEC No 204-498-2 | No 607-198-00-3



3,4,5-trihidroxybenzoato de propilo

Clasificación,

Xn ; R 22	R 43

Etiquetado,

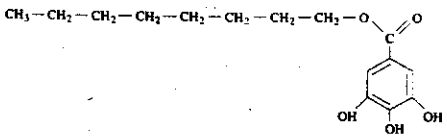
Xn

R : 22-43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 1034-01-0 | EEC No 213-853-0 | No 607-199-00-9



3,4,5-trihidroxybenzoato de octilo

Clasificación,

Xn ; R 22	R 43

Etiquetado,

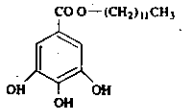
Xn

R : 22-43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 1166-52-5 | EEC No 214-620-6 | No 607-200-00-2



3,4,5-trihidroxybenzoato de dodecilo

Clasificación,

R 43

Etiquetado,

Xi

R : 43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 463-71-8 | EEC No 207-341-6 | No 607-201-00-X

cloruro de tiocarbonilo

Clasificación,

T ; R 23	Xn ; R 22	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

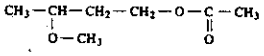
T

R : 22-23-36/37/38

S : (1/2-)7-9-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 4435-53-4 | EEC No 224-644-9 | No 607-202-00-3



acetato de 3-metoxibutilo

Clasificación,

Xi ; R 36

Etiquetado,

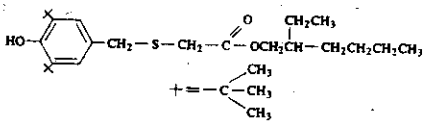
Xi

R : 36

S : (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 80387-97-9 | EEC No 279-452-8 | No 607-203-00-9



3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil metil tio acetato de 2-etilhexilo

Clasificación.

Repr. Cat. 2; R 61	R 43

Etiquetado.

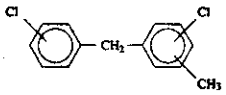
T

R: 61-43

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No 400-140-6 | No 607-204-00-4



(clorofenil)(clorotolil)metano, mezcla de isómeros

Clasificación.

N; R 50-53

Etiquetado.

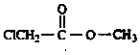
N

R: 50/53

S: 60-61

Límites de concentración.

Cas No 96-34-4 | EEC No 202-501-1 | No 607-205-00-X



cloroacetato de metilo

Clasificación.

R 10	T; R 23/25	Xi; R 37/38-41

Etiquetado.

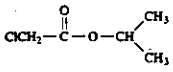
T

R: 10-23/25-37/38-41

S: (1/2-)26-37/39-45

Límites de concentración.

Cas No 105-48-6 | EEC No 203-301-7 | No 607-206-00-5



cloroacetato de isopropilo

Clasificación.

R 10	T; R 25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

T

R: 10-25-36/37/38

S: (1/2-)26-37/39-45

Límites de concentración.

Cas No 75-05-8	EEC No 200-835-2	No 608-001-00-3

$CH_3 — CN$

acetonitrilo; cianuro de metilo

Clasificación.

F; R 11	T; R 23/24/25

Etiquetado.

R: 11-23/24/25

S: (1/2-)16-27-45

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	T; R 23/24/25
3 % ≤ C < 20 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 545-06-2	EEC No 208-885-7	No 608-002-00-9

$CCl_3 — CN$

tricloroacetonitrilo

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

R: 23/24/25

S: (1/2-)45

Límites de concentración.

Cas No 107-13-1	EEC No 203-466-5	No 608-003-00-4

NOTA D

NOTA E

$CH_2 = CH — CN$

acrilonitrilo

Clasificación.

F; R 11	Carc. Cat. 2; R 45	T; R 23/24/25	Xi; R 38

Etiquetado.

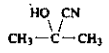
R: 45-11-23/24/25-38

S: 53-45

Límites de concentración.

C ≥ 20 %	T; R 45-23/24/25-38
1 % ≤ C < 20 %	T; R 45-23/24/25
0,2 % ≤ C < 1 %	T; R 45-20/21/22
0,1 % ≤ C < 0,2 %	T; R 45

Cas No 75-86-5	EEC No 200-909-4	No 608-004-00-X



2-ciano-2-propanol; acetoncianhidrina

Clasificación.

T+; R 26/27/28

Etiquetado.

R: 26/27/28

S: (1/2-)7/9-27-45

Límites de concentración.

Cas No 109-74-0	EEC No 203-700-6	No 608-005-00-5

$CH_3-CH_2-CH_2-C\equiv N$

n-butironitrilo

Clasificación.

R 10	T; R 23/24/25

Etiquetado.

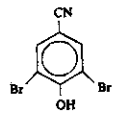
T

R: 10-23/24/25

S: (1/2-)45

Límites de concentración.

Cas No 1689-84-5	EEC No 216-882-7	No 608-006-00-0



bromoxinil (ISO); 3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo

Clasificación.

Repr. Cat. 3; R 63	T; R 25

Etiquetado.

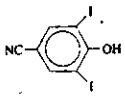
T

R: 25-63

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 1689-83-4	EEC No 216-881-1	No 608-007-00-6



ioxinil (ISO); 4-hidroxi-3,5-diiodobenzonitrilo

Clasificación.

Repr. Cat. 3; R 63	T; R 25	Xn; R 21

Etiquetado.

T

R: 21-25-63

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 107-14-2	EEC No 203-467-0	No 608-008-00-1

CH_2Cl-CN

cloroacetonitrilo

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)45

Límites de concentración.

Cas No 109-77-3	EEC No 203-703-2	No 608-009-00-7

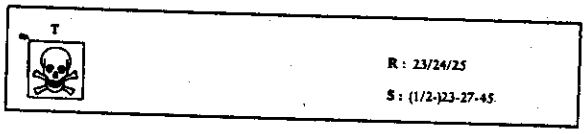
$CN-CH_2-CN$

malononitrilo

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.



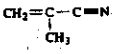
R: 23/24/25

S: (1/2-)23-27-45

Límites de concentración.

Cas No 126-98-7	EEC No 204-817-5	No 608-010-00-2

NOTA D



2-metil-2-propeno-nitrilo; metacrilonitrilo

Clasificación.

F; R 11	T; R 23/24/25	R 43

Etiquetado.

R: 11-23/24/25-43

S: (1/2-)9-16-18-29-45

Límites de concentración.

C ≥ 1 %	T; R 23/24/25-43
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22-43

Cas No 460-19-5	EEC No 207-306-5	No 608-011-00-8

cianógeno; oxalonitrilo

Clasificación.

F; R 11	T; R 23

Etiquetado.

R: 11-23

S: (1/2-)23-45

Límites de concentración.

Cas No 100-47-0	EEC No 202-855-7	No 608-012-00-3

benzonitrilo

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

R: 21/22

S: (2-)23

Límites de concentración.

Cas No 873-32-5 | EEC No 212-836-5 | No 608-013-00-9

2-clorobenzonitrilo

Clasificación,

Xn ; R 21/22	Xi ; R 36

Etiquetado,

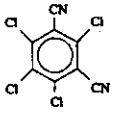
Xn

R : 21/22-36

S : (2-)23

Límites de concentración,

Cas No 1897-45-6 | EEC No 217-588-1 | No 608-014-00-4



clorotalonil (ISO) ; tetracloroisoftalonitrilo

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

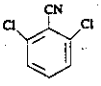
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 1194-65-6 | EEC No 214-787-5 | No 608-015-00-X



diclobenil (ISO) ; 2,6-diclorobenzonitrilo

Clasificación,

Xn ; R 21

Etiquetado,

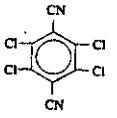
Xn

R : 21

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 1897-41-2 | EEC No 401-550-8 | No 608-016-00-5



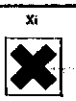
tetracloroteftalonitrilo

Clasificación,

R 43	R 53

Etiquetado,

Xi

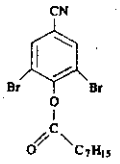


R : 43-53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 1689-99-2	EEC No 216-885-3	No 608-017-00-0



octanoato de 2,6-dibromo-4-cianofenilo

Clasificación,

Repr. Cat. 3 ; R 63	Xn ; R 21/22

Etiquetado,

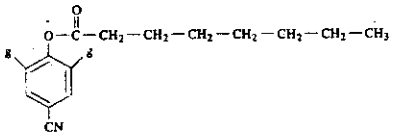
Xn

R : 21/22-63

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 3861-47-0	EEC No 223-375-4	No 608-018-00-6



octanoato de 4-ciano-2,6-diiodofenilo

Clasificación,

Repr. Cat. 3 ; R 63	Xn ; R 22

Etiquetado,

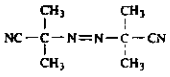
Xn

R : 22-63

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 78-67-1	EEC No 201-132-3	No 608-019-00-1



2,2'-dimetil-2,2'-azodipropiononitrilo

Clasificación,

E ; R 2	F ; R 11	Xn ; R 20/22

Etiquetado,

E Xn

R : 2-11-20/22

S : (2-)39-41-47

Límites de concentración,

Cas No 108-03-2	EEC No 203-544-9	No 609-001-00-6

$CH_3 - CH_2 - CH_2 - NO_2$

1-nitropropano

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 10-20/21/22

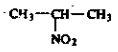
S : (2-)9

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No 79-46-9	EEC No 201-209-1	No 609-002-00-1

NOTA E



2-nitropropano

Clasificación.

R 10	Carc. Cat. 2; R 45	Xn; R 20/22

Etiquetado.

T

R: 45-10-20/22

S: 53-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	T; R 45-20/22
0,1 % ≤ C < 25 %	T; R 45

Cas No 98-95-3	EEC No 202-716-0	No 609-003-00-7

nitrobenceno

Clasificación.

T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

T+

R: 26/27/28-33

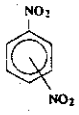
S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

C ≥ 7 %	T+; R 26/27/28-33
1 % ≤ C < 7 %	T; R 23/24/25-33
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn; R 20/21/22-33

Cas No 25154-54-5 (mix)	EEC No 246-673-6	No 609-004-00-2

NOTA C



dinitrobenceno

Clasificación.

T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

T+

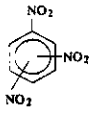
R: 26/27/28-33

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 25377-32-6 (mix)	EEC No —	No 609-005-00-8

NOTA C



trinitrobenceno

Clasificación.

E; R 2	T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

E

T+

R: 2-26/27/28-33

S: (1/2-)35-45

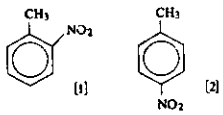
Límites de concentración.

Cas No 88-72-2 [1]
99-99-0 [2]

EEC No 201-853-3 [1]
202-808-0 [2]

No 609-006-00-3

NOTA C

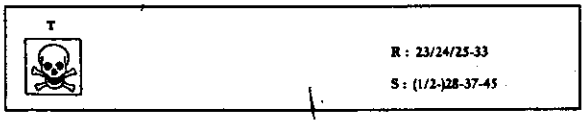


2-nitrotolueno [1], 4-nitrotolueno [2]

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.



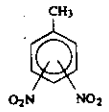
Límites de concentración.

Cas No 25321-14-6

EEC No 246-836-1

No 609-007-00-9

NOTA C



dinitrotolueno

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

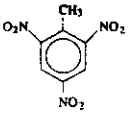
Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 118-96-7

EEC No 204-289-6

No 609-008-00-4



2,4,6-trinitrotolueno ; TNT

Clasificación.

E; R 2	T; R 23/24/25	R 33

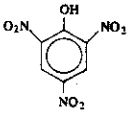
Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 88-89-1

EEC No 201-865-9

No 609-009-00-X

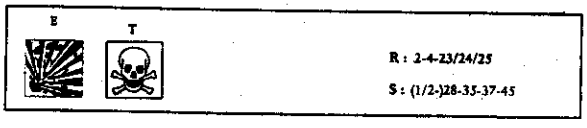


2,4,6-trinitrofenol ; ácido pícrico

Clasificación.

E; R 2	R 4	T; R 23/24/25

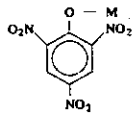
Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No —	EEC No —	No 609-010-00-5

NOTA A



sales de ácido pícrico; picratos

Clasificación.

E; R 3	T; R 23/24/25

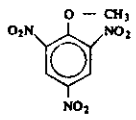
Etiquetado.

R: 3-23/24/25

S: (1/2-)28-35-37-45

Límites de concentración.

Cas No 606-35-9	EEC No —	No 609-011-00-0

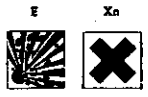


2,4,6-trinitroanisol

Clasificación.

E; R 2	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.



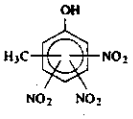
R: 2-20/21/22

S: (2-)35

Límites de concentración.

Cas No 28905-71-7	EEC No —	No 609-012-00-6

NOTA C

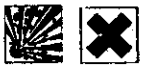


trinitrocresol

Clasificación.

E; R 2	R 4	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.



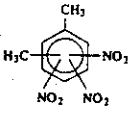
R: 2-4-20/21/22

S: (2-)35

Límites de concentración.

Cas No 67297-26-1 (mix)	EEC No —	No 609-013-00-1

NOTA C

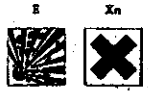


trinitroxileno

Clasificación.

E; R 2	Xn; R 20/21/22	R 33

Etiquetado.



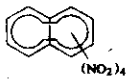
R: 2-20/21/22-33

S: (2-)35

Límites de concentración.

Cas No 55810-18-9 (mix)	EEC No —	No 609-014-00-7

NOTA C



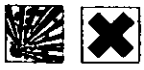
tetranitronaftaleno

Clasificación,

E; R 2	Xn; R 20/21/22	R 33

Etiquetado,

E Xn



R: 2-20/21/22-33

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No 100-02-7	EEC No 202-811-7	No 609-015-00-2

4-nitrofenol; *p*-nitrofenol

Clasificación,

Xn; R 20/21/22	R 33

Etiquetado,

Xn

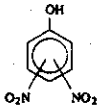
R: 20/21/22-33

S: (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 25550-58-7	EEC No 247-096-2	No 609-016-00-8

NOTA C



dinitrofenol

Clasificación,

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

T

R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-37-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 609-017-00-3

NOTA A

sales de dinitrofenol

Clasificación,

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

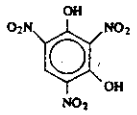
T

R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-37-45

Límites de concentración,

Cas No 82-71-3	EEC No 201-436-6	No 609-018-00-9



2,4,6-trinitroresorcinol; ácido estífnico

Clasificación,

E; R 2	R 4	Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

E Xn

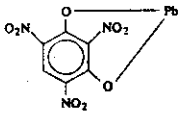
R: 2-4-20/21/22

S: (2-)35

Límites de concentración,

Cas No 15245-44-0	EEC No 239-290-0	No 609-019-00-4

NOTA E



2,4,6-trinitroresorcinato de plomo; estifnato de plomo

Clasificación,

E; R 3	Repr. Cat. 1; R 61	Xn; R 20/22	R 33

Etiquetado,

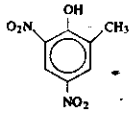
E T

R: 61-3-20/22-33

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 534-52-1	EEC No 208-601-1	No 609-020-00-X



DNOC; 4,6-dinitro-o-cresol

Clasificación,

R 44	T+; R 27/28	Muta. Cat. 3; R 40	Xi; R 36	R 33

Etiquetado,

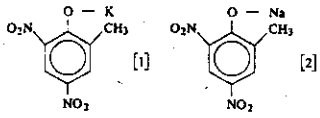
T+

R: 27/28-33-36-40-44

S: 36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 5787-96-2 (1) 2312-76-7 (2)	EEC No 219-007-7 [2]	No 609-021-00-5



sal de potasio del DNOC; sal de sodio del DNOC

Clasificación,

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

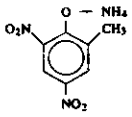
T

R: 23/24/25-33

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 2980-64-5	EEC No 221-037-0	No 609-022-00-0



sal de amonio del DNOC

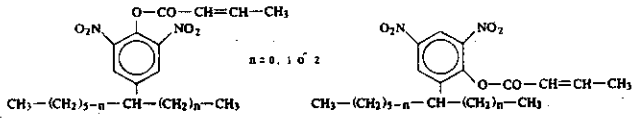
Clasificación.

T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 39300-45-3	EEC No 254-408-0	No 609-023-00-6

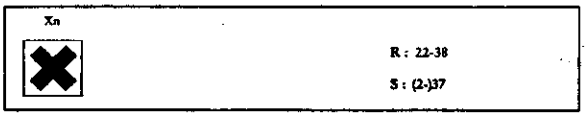


dinocap (ISO) ; mezcla de isómeros ; crotonato de 2,6-dinitro-4-octilfenilo, crotonato de 2,4-dinitro-6-octilfenilo

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 38

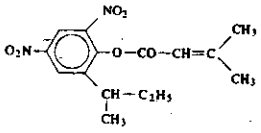
Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 485-31-4	EEC No 207-612-9	No 609-024-00-1

NOTA E



binapacril (ISO) ; 3-metilcrotonato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo

Clasificación.

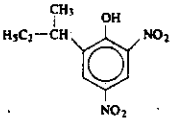
Repr. Cat. 2 ; R 61	Xn ; R 21/22

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 88-85-7	EEC No 201-861-7	No 609-025-00-7

NOTA E



dinoseb ; 6-sec-butil-2,4-dinitrofenol

Clasificación.

R 44	T ; R 24/25	Repr. Cat. 2 ; R 61	Repr. Cat. 3 ; R 62	Xi ; R 36	N ; R 50-53

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 609-026-00-2

sales y ésteres de dinoseb, excepto aquellos especificamente expresados en este Anexo

Clasificación.

R 44	T; R 24/25	Repr. Cat. 2; R 61	Repr. Cat. 3; R 62	Xi; R 36

Etiquetado.

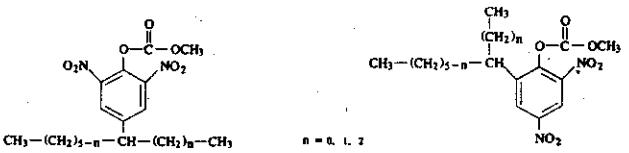
T

R: 61-62-24/25-36-44

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 63919-26-6 | EEC No — | No 609-027-00-8



dinocton; mezcla de los isómeros de reacción: carbonato de metilo y de 2,6-dinitro-4-octilfenilo, carbonato de metilo y de 2,4-dinitro-6-octilfenilo

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

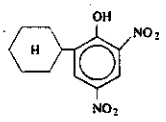
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 131-89-5 | EEC No 205-042-5 | No 609-028-00-3



2-ciclohexil-4,6-dinitrofenol; dinex

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 609-029-00-9

NOTA A

sales y ésteres de dinex

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

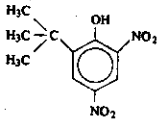
R: 23/24/25

S: (1/2-)13-45

Límites de concentración.

Cas No 1420-07-1 | EEC No 215-813-8 | No 609-030-00-4

NOTA E



dinoterb ; 2-ter-butil-4,6-dinitrofenol

Clasificación,

Repr. Cat. 2 ; R 61	T ; R 24/25	Xi ; R 36	R 44

Etiquetado,

T

R : 61-24/25-36-44

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 609-031-00-X

NOTA A

NOTA E

sales y ésteres de dinoterb

Clasificación,

Repr. Cat. 2 ; R 61	T ; R 23/24/25

Etiquetado,

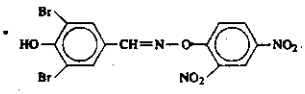
T

R : 61-23/24/25

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 13181-17-4 | EEC No 236-129-6 | No 609-032-00-5



bromofenoxim ; 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehido-O-(2,4-dinitrofenil)oxima

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

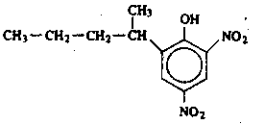
Xn

R : 22

S : (2-)25

Límites de concentración,

Cas No 4097-36-3 | EEC No — | No 609-033-00-0



dinosam ; 2-(1-metilbutil)-4,6-dinitrofenol

Clasificación,

T ; R 23/24/25

Etiquetado,

T

R : 23/24/25

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 609-034-00-6

NOTA A

sales y ésteres de dinosam

Clasificación.

T ; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R : 23/24/25

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración.

Cas No 79-24-3	EEC No 201-188-9	No 609-035-00-1

$CH_3 — CH_2 — NO_2$

nitroetano

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20/22

Etiquetado.

Xn

R : 10-20/22

S : (2-)9-25-41

Límites de concentración.

C ≥ 12,5 %	Xn ; R 20/22

Cas No 75-52-5	EEC No 200-876-6	No 609-036-00-7

nitrometano

Clasificación.

R 5-10	Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

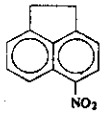
R : 5-10-22

S : (2-)41

Límites de concentración.

C ≥ 12,5 %	Xn ; R 22

Cas No 602-87-9	EEC No 210-025-0	No 609-037-00-2



5-nitroacenafteno

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado.

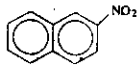
T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 581-89-5 | EEC No 209-474-5 | No 609-038-00-8



2-nitronaftaleno

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado,

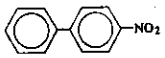
T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 92-93-3 | EEC No 202-204-7 | No 609-039-00-3



4-nitrobifenilo

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado,

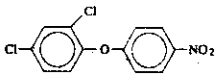
T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 1836-75-5 | EEC No 217-406-0 | No 609-040-00-9



nitrofene (ISO); 2,4-diclorofenil 4-nitrofenil éter

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45 | Repr. Cat. 2; R 61

Etiquetado,

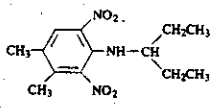
T

R: 45-61

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 40487-42-1 | EEC No 254-938-2 | No 609-042-00-X



N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

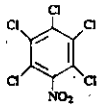
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 82-68-8 | EEC No 201-435-0 | No 609-043-00-5



quintoceno (ISO); pentacloronitrobenzeno

Clasificación.

R 43

Etiquetado.

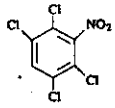
Xi

R: 43

S: (2-)24-37

Límites de concentración.

Cas No 117-18-0 | EEC No 204-178-2 | No 609-044-00-0



tecnaceno (ISO); 1,2,4,5-tetracloro-3-nitrobenceno

Clasificación.

R 43

Etiquetado.

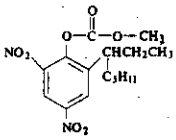
Xi

R: 43

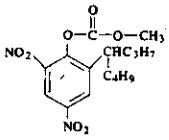
S: (2-)24-37

Límites de concentración.

Cas No 8069-76-9 | EEC No — | No 609-045-00-6



(I)



(II)

carbonato de 4,6-dinitro-2-(3-octil)fenilo y de metilo--carbonato de 4,6-dinitro-2-(4-octil)fenilo y de metilo; dinocton-6

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

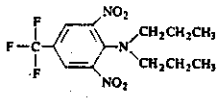
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 1582-09-8 | EEC No 216-428-8 | No 609-046-00-1



trifluralina (ISO); (conteniendo < 0,5 p.p.m. de NPDA)

Clasificación.

Xi; R 36 | R 43

Etiquetado.

Xi

R: 36-43

S: (2-)24-37

Límites de concentración.

Cas No 76-06-2	EEC No 200-930-9	No 610-001-00-3

tricloronitrometano ; cloropicrina

Clasificación,

Xn ; R 22	T+ ; R 26	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

T+

R : 22-26-36/37/38

S : (1/2-)36/37-38-45

Límites de concentración,

Cas No 594-72-9	EEC No 209-854-0	No 610-002-00-9

1,1-dicloro-1-nitroetano

Clasificación,

T ; R 23/24/25

Etiquetado,

T

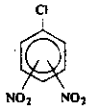
R : 23/24/25

S : (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 25567-67-3 (mix)	EEC No 247-109-1	No 610-003-00-4

NOTA C



clorodinitrobenceno

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

T

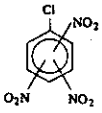
R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-37-45

Límites de concentración,

Cas No 28260-61-9 (mix)	EEC No —	No 610-004-00-X

NOTA C



clorotrinitrobenceno

Clasificación,

E ; R 2	T+ ; R 26/27/28

Etiquetado,

E

T+

R : 2-26/27/28

S : (1/2-)35-45

Límites de concentración,

Cas No 100-00-5 | EEC No 202-809-6 | No 610-005-00-5

1-cloro-4-nitrobenceno; *p*-cloronitrobenceno

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

T

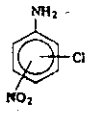
R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-37-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 610-006-00-0

NOTA C



cloronitroanilina

Clasificación.

T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

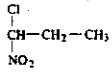
T+

R: 26/27/28-33

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 600-25-9 | EEC No 209-990-0 | No 610-007-00-6



1-cloro-1-nitropropano

Clasificación.

Xn; R 20/22

Etiquetado.

Xn

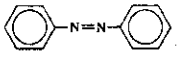
R: 20/22

S: (2)

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xn; R 20/22

Cas No 103-33-3 | EEC No 203-102-5 | No 611-001-00-6



azobenceno

Clasificación.

Xn; R 20/22

Etiquetado.

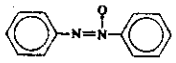
Xn

R: 20/22

S: (2-)28

Límites de concentración.

Cas No 495-48-7 | EEC No 207-802-1 | No 611-002-00-1



azoxibenceno

Clasificación.

Xn ; R 20/22

Etiquetado.

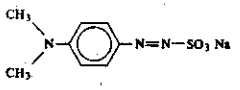
Xn

R : 20/22

S : (2-)28

Límites de concentración.

Cas No 140-56-7 | EEC No 205-419-4 | No 611-003-00-7



fenaminosulf (ISO) ; 4-dimetilaminobencenodiazosulfonato de sodio

Clasificación.

T ; R 25 | Xn ; R 21

Etiquetado.

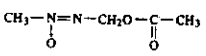
T

R : 21-25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 592-62-1 | EEC No 209-765-7 | No 611-004-00-2



acetato de metil-ONN-azoximetilo ; acetato de metilazoximetilo

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45 | Repr. Cat. 2 ; R 61

Etiquetado.

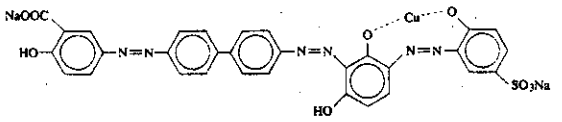
T

R : 45-61

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 16071-86-6 | EEC No 240-221-1 | No 611-005-00-8



[5-[(4'-((2,6-dihidroxi-3-((2-hidroxi-5-sulfofenil)azo)fenil)azo)(1,1'-bifenil)-4-il)azo]salicilato(4-)]cuprato(2-) de disodio

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado.

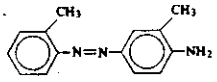
T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 97-56-3 | EEC No 202-591-2 | No 611-006-00-3



4-o-tolilazo-o-toluidina ; 4-amino-2',3-dimetilazobenceno ; fast garnet GBC base ; AAT

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	R 43

Etiquetado.

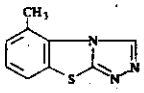
T

R : 45-43

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 41814-78-2 | EEC No 255-559-5 | No 611-007-00-9



5-metil-1,2,4-triazolo(3,4-b)benzo-1,3-tiazol ; tricyclazol

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

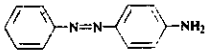
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 60-09-3 | EEC No 200-453-6 | No 611-008-00-4



4-aminoazobenceno

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado.

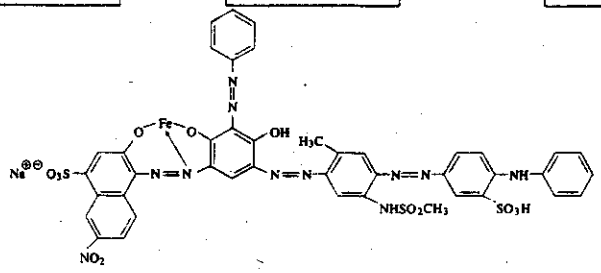
T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No 401-220-3 | No 611-009-00-X



(1-(5-(4-(4-anilino-3-sulfofenilazo)-2-metil-5-metilsulfonamidofenilazo)-3-fenilazo-4-hidroxi-2-óxidofenilazo)-o 5-nitro-4-sulfonato-2-naftolato) hierro(II) de sodio

Clasificación.

Xn : R 20	R 52-53

Etiquetado.

Xn

R : 20-52/53

S : (2-)61

Límites de concentración.

Cas No 74-89-5 [1] 124-40-3 [2] 75-50-3 [3]	EEC No 200-820-0 [1] 204-697-4 [2] 200-875-0 [3]	No 612-001-00-9

NOTA C

CH_3NH_2 [1]
$(CH_3)_2NH$ [2]
$(CH_3)_3N$ [3]

metilamina (mono-[1], di-[2], tri-[3])

Clasificación,

F+ ; R 12	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

F+ Xi

R : 12-36/37

S : (2-)16-26-29

Límites de concentración,

Cas No 75-04-7	EEC No 200-834-7	No 612-002-00-4

$C_2H_5NH_2$

etilamina

Clasificación,

F+ ; R 12	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

F+ Xi

R : 12-36/37

S : (2-)16-26-29

Límites de concentración,

Cas No 109-89-7	EEC No 203-716-3	No 612-003-00-X

$(C_2H_5)_2NH$

dietilamina

Clasificación,

F ; R 11	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

F Xi

R : 11-36/37

S : (2-)16-26-29

Límites de concentración,

Cas No 121-44-8	EEC No 204-469-4	No 612-004-00-5

$(C_2H_5)_3N$

trietilamina

Clasificación,

F ; R 11	Xi ; R 36/37

Etiquetado,

F Xi

R : 11-36/37

S : (2-)16-26-29

Límites de concentración,

Cas No 109-73-9	EEC No 203-699-2	No 612-005-00-0

$C_4H_9 — NH_2$

butilamina

Clasificación,

F ; R 11	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

F Xi

R : 11-36/37/38

S : (2-)16-26-29

Límites de concentración,

Cas No 107-15-3	EEC No 203-468-6	No 612-006-00-6

$H_2N — CH_2 — CH_2 — NH_2$

1,2-diaminoetano ; etilendiamina

Clasificación,

R 10	C ; R 34	Xn ; R 21/22	R 43

Etiquetado,

C

R : 10-21/22-34-43

S : (1/2-)9-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
2 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 2 %	Xi ; R 43

Cas No 75-31-0	EEC No 200-860-9	No 612-007-00-1

$CH_3 — CH(NH_2) — CH_3$

2-aminopropano ; isopropilamina

Clasificación,

F+ ; R 12	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

F+ Xi

R : 12-36/37/38

S : (2-)16-26-29

Límites de concentración,

Cas No 62-53-3	EEC No 200-539-3	No 612-008-00-7

anilina

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	T ; R 48/23/24/25	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

T

R : 20/21/22-40-48/23/24/25

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	T ; R 20/21/22-40-48/23/24/25
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 48/20/21/22

Cas No —	EEC No —	No 612-009-00-2

sales de anilina

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	T ; R 48/23/24/25	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

T

R : 20/21/22-40-48/23/24/25

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

C ≥ 1 %	T ; R 20/21/22-40-48/23/24/25
0,2 % ≤ C < 1 %	Xn ; R 48/20/21/22

Cas No 27134-26-5 [1] 27134-27-6 [2] 54686-91-8 [3]	EEC No —	No 612-010-00-8

NOTA C

$ClC_6H_4NH_2$ [1]

$Cl_2C_6H_3NH_2$ [2]

$Cl_3C_6H_2NH_2$ [3]

cloroanilina (mono- [1], di- [2], tri- [3])

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

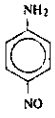
T

R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 659-49-4	EEC No 211-535-6	No 612-011-00-3



4-nitrosoanilina ; p-nitrosoanilina

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

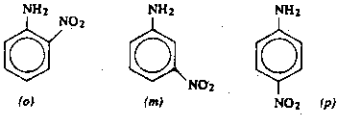
R : 20/21/22

S : (2-)25-28

Límites de concentración,

Cas No 88-74-4 (o) 99-09-2 (m) 100-01-6 (p)	EEC No 201-855-4 (o) 202-729-1 (m) 202-810-1 (p)	No 612-012-00-9

NOTA C



nitroanilina (o,m,p)

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

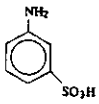
T

R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 121-47-1 | EEC No 204-473-6 | No 612-013-00-4



ácido 3-aminobencenosulfónico; ácido metanílico

Clasificación.

Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

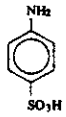
Xn

R: 20/21/22

S: (2-)25-28

Límites de concentración.

Cas No 121-57-3 | EEC No 204-482-5 | No 612-014-00-X



ácido 4-amino-bencenosulfónico; ácido sulfanílico

Clasificación.

Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

Xn

R: 20/21/22

S: (2-)25-28

Límites de concentración.

Cas No 100-61-8 | EEC No 202-870-9 | No 612-015-00-5

N-metilanilina

Clasificación.

T; R 23/24/25 | R 33

Etiquetado.

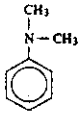
T

R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-37-45

Límites de concentración.

Cas No 121-69-7 | EEC No 204-493-5 | No 612-016-00-0



N,N-dimetilanilina

Clasificación.

T; R 23/24/25 | R 33

Etiquetado.

T

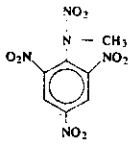
R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-37-45

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	T; R 23/24/25-33
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21/22-33

Cas No 479-45-8 | EEC No 207-531-9 | No 612-017-00-6

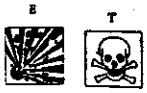


N-metil-*N*-2,4,6-tetranitroanilina ; tetril

Clasificación.

E ; R 2	T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

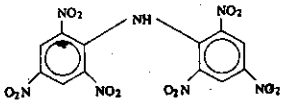


R : 2-23/24/25-33

S : (1/2-)35-45

Límites de concentración.

Cas No 131-73-7 | EEC No 205-037-8 | No 612-018-00-1



bis(2,4,6-trinitrofenil)amina ; hexil

Clasificación.

E ; R 2	T+ ; R 26/27/28	R 33

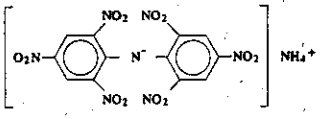
Etiquetado.

R : 2-26/27/28-33

S : (1/2-)35-36-45

Límites de concentración.

Cas No 2844-92-0 | EEC No 220-639-0 | No 612-019-00-7

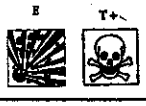


sal de amonio del hexil

Clasificación.

E	R 1	T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.

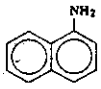


R : 1-26/27/28-33

S : (1/2-)35-36-45

Límites de concentración.

Cas No 134-32-7 | EEC No 205-138-7 | No 612-020-00-2



1-naftilamina ; α-naftilamina

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

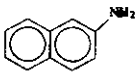
R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 91-59-8	EEC No 202-080-4	No 612-022-00-3

NOTA E



2-naftilamina

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

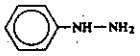
R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	T ; R 45-22
0,01 % ≤ C < 25 %	T ; R 45

Cas No 100-63-0	EEC No 202-873-5	No 612-023-00-9



fenilhidracina

Clasificación,

T ; R 23/24/25	Xi ; R 36

Etiquetado,

T

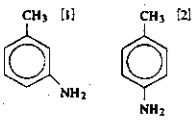
R : 23/24/25-36

S : (1/2-)28-45

Límites de concentración,

Cas No 108-44-1 [1] 106-49-0 [2]	EEC No 203-583-1 [1] 203-403-1 [2]	No 612-024-00-4

NOTA C



m-toluidina [1]; p-toluidina [2]

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

T

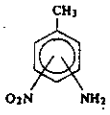
R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 89-62-3 60999-18-0	EEC No 201-924-9	No 612-025-00-X

NOTA C



nitrotoluidina

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

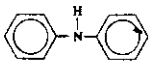
T

R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 122-39-4	EEC No 204-539-4	No 612-026-00-5



difenilamina

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

T

R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 1300-73-8	EEC No 215-091-4	No 612-027-00-0

NOTA C

xilidina

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

T

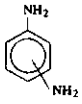
R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 25265-76-3	EEC No —	No 612-028-00-6

NOTA C



fenilendiamina

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 43

Etiquetado.

T

R: 23/24/25-43

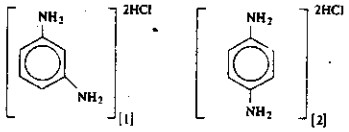
S: (1/2-)28-45

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	T; R 23/24/25-43
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21/22-43

Cas No 541-69-5 [1] 624-18-0 [2]	EEC No 208-790-0 [1] 210-834-9 [2]	No 612-029-00-1

NOTA C



diclorhidrato de m-fenilendiamina [1], diclorhidrato de p-fenilendiamina [2]

Clasificación.

T; R 23/24/25

Etiquetado.

T

R: 23/24/25

S: (1/2-)28-45

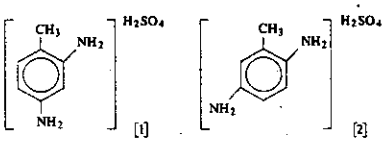
Límites de concentración.

Cas No 74283-36-6 [1]
6369-59-1 [2]

EEC No 228-871-4 [2]

No 612-030-00-7

NOTA C



sulfato de 2,4-diaminotolueno [1], sulfato de 2,5-diaminotolueno [2]

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

S : (2-)28

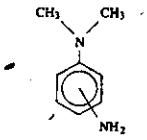
Límites de concentración,

Cas No 2836-03-5 (*o*)
2836-04-6 (*m*)
99-98-9 (*p*)
28675-03-8 (*mix*)

EEC No 220-623-3 (m)
202-807-5 (p)

No 612-031-00-2

NOTA C



N,N-dimetiltenilendiamina (*o,m,p*)

Clasificación,

T ; R 23/24/25

Etiquetado,

T

R : 23/24/25

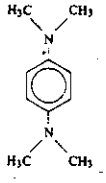
S : (1/2-)28-45

Límites de concentración,

Cas No 100-22-1

EEC No 202-831-6

No 612-032-00-8



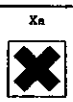
N,N,N'-N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn



R : 20/21/22

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 95-55-6 [1]
591-27-5 [2]
123-30-8 [3]
27598-85-2 (*mix*)

EEC No 202-431-1 [1]
209-711-2 [2]
204-616-2 [3]

No 612-033-00-3

NOTA C

aminofenol (o-[1], m-[2], p-[3])

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

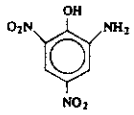
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 96-91-3	EEC No 202-544-6	No 612-034-00-9



2-amino-4,6-dinitrofenol ; ácido picrámico

Clasificación,

E	R 1	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

E Xn

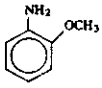
R : 1-20/21/22

S : (2-)35

Límites de concentración,

Cas No 90-04-0	EEC No 201-963-1 (o)	No 612-035-00-4

NOTA E



2-metoxianilina ; o-anisidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado,

T+

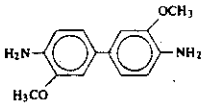
R : 45-26/27/28-33

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 119-90-4	EEC No 204-355-4	No 612-036-00-X

NOTA E



3,3'-dimetoxibencidina ; o-dianisidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 612-037-00-5

NOTA A

NOTA E

sales de 3,3'-dimetoxibencidina ; sales de o-dianisidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

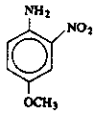
T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 96-96-8 | EEC No 202-547-2 | No 612-038-00-0



4-metoxi-2-nitroanilina ; 2-nitro-*p*-anisidina

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado,

T+

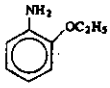
R : 26/27/28-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 94-70-2 [1] 156-43-4 [2] | EEC No 202-356-4 [1] 205-855-5 [2] | No 612-039-00-6

NOTA C



[1]

[2]

2-etoxianilina ; o-fenetidina, [1] 4-etoxianilina ; p-fenetidina [2]

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

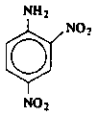
T

R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 97-02-9 | EEC No 202-553-5 | No 612-040-00-1



2,4-dinitroanilina

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28	R 33

Etiquetado,

T+

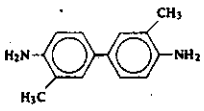
R : 26/27/28-33

S : (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 119-93-7 | EEC No 204-358-0 | No 612-041-00-7

NOTA E



3,3'-dimetilbencidina ; o-tolidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

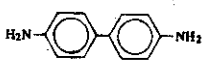
R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 92-87-5 | EEC No 202-199-1 | No 612-042-00-2

NOTA E



bencidina ; 4,4'-diaminobifenilo

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45 | Xn ; R 22

Etiquetado,

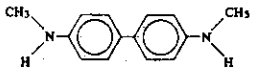
T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 2810-74-4 | EEC No — | No 612-043-00-8



N,N'-dimetilbencidina

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

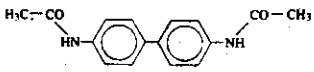
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)22-36

Límites de concentración,

Cas No 613-35-4 | EEC No 210-338-2 | No 612-044-00-3



N,N'-diacetilbencidina

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

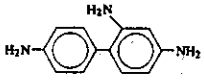
Xn

R : 20/21/22

S : (2-)22-36

Límites de concentración,

Cas No 2835-69-0 | EEC No — | No 612-045-00-9



2-aminobencidina

Clasificación,

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado,

Xn

R : 20/21/22

S : (2-)22-36

Límites de concentración,

Cas No 107-11-9	EEC No 203-463-9	No 612-046-00-4

$CH_2 = CH - CH_2 - NH_2$

alilamina

Clasificación,

F; R 11	T; R 23/24/25

Etiquetado,

F T

R: 11-23/24/25

S: (1/2-)9-16-24/25-45

Límites de concentración,

Cas No 100-46-9	EEC No 202-854-1	No 612-047-00-X

bencilamina

Clasificación,

C; R 34

Etiquetado,

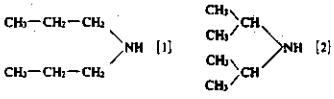
C

R: 34

S: (1/2-)26-45

Límites de concentración,

Cas No 142-84-7 [1] 108-18-9 [2]	EEC No 205-565-9 [1] 203-558-5 [2]	No 612-048-00-5



di-*n*-propilamina [1], di-isopropilamina [2]

Clasificación,

F; R 11	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

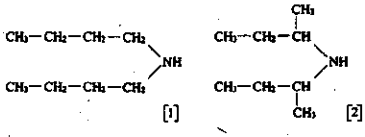
F Xi

R: 11-36/37/38

S: (2-)9-16

Límites de concentración,

Cas No 111-92-2 [1] 626-23-3 [2]	EEC No 203-921-8 [1] 210-937-9 [2]	No 612-049-00-0



di-*n*-butilamina [1], di-*sec*-butilamina [2]

Clasificación,

R 10	Xn; R 20/21/22

Etiquetado,

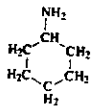
Xn

R: 10-20/21/22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 108-91-8	EEC No 203-629-0	No 612-050-00-6



ciclohexilamina

Clasificación,

R 10	Xn ; R 21/22	C ; R 34

Etiquetado,

C

R : 10-21/22-34

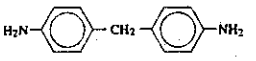
S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34
2 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38

Cas No 101-77-9	EEC No 202-974-4	No 612-051-00-1

NOTA E



4,4-metilendianilina ; 4,4'-diaminodifenilmetano

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 20/21/22 - R 48/20/21	R 43

Etiquetado,

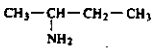
T

R : 45-20/21/22-48/20/21-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 13952-84-6	EEC No 237-732-7	No 612-052-00-7



sec-butilamina

Clasificación,

F ; R 11	Xn ; R 20/22	C ; R 35

Etiquetado,

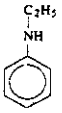
F C

R : 11-20/22-35

S : (1/2-)9-16-26-28-36 /37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 103-69-5	EEC No 203-135-5	No 612-053-00-2



N-etilanilina

Clasificación,

T ; R 23/24/25	R 33

Etiquetado,

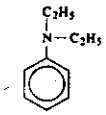
T

R : 23/24/25-33

S : (1/2-)28-37-45

Límites de concentración,

Cas No 91-66-7	EEC No 202-088-8	No 612-054-00-8



N,N-dietilanilina

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

T

R: 23/24/25-33

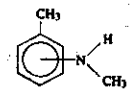
S: (1/2-)28-37-45

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	T; R 23/24/25-33
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21/22-33

Cas No 611-21-2 [1] 696-44-6 [2] 623-08-5 [3] 84875-83-2 (*mix*)	EEC No 210-260-9 [1] 211-795-0 [2] 210-769-6 [3]	No 612-055-00-3

NOTA C



N-metiltoluidina (o-[1], m-[2], p-[3])

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

T

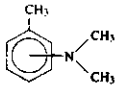
R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 29256-93-7	EEC No —	No 612-056-00-9

NOTA C



N,N-dimetiltoluidina

Clasificación.

T; R 23/24/25	R 33

Etiquetado.

T

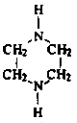
R: 23/24/25-33

S: (1/2-)28-36/37-45

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	T; R 23/24/25-33
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21/22-33

Cas No 110-85-0	EEC No 203-808-3	No 612-057-00-4



piperazina; dietilendiamina

Clasificación.

C; R 34

Etiquetado.

C

R: 34

S: (1/2-)26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 111-40-0 | EEC No 203-865-4 | No 612-058-00-X

$NH_2 — CH_2 — CH_2 — NH — CH_2 — CH_2 — NH_2$

1,5-diamino-3-azopentano ; dietilentriamina

Clasificación,

Xn ; R 21/22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

R : 21/22-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 112-24-3 | EEC No 203-950-6 | No 612-059-00-5

$NH_2 — CH_2 — CH_2 — NH — CH_2 — CH_2 — NH — CH_2 — CH_2 — NH_2$

3,6-diazaoctano-1,8-diamina ; trietilentetramina

Clasificación,

Xn ; R 21	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

R : 21-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 112-57-2 | EEC No 203-986-2 | No 612-060-00-0

$NH_2 — (CH_2 — CH_2 — NH)_2 — CH_2 — CH_2 — NH_2$

3,6,9-triazaundecano-1,11-diamina ; tetrasetilenpentamina

Clasificación,

Xn ; R 21/22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

R : 21/22-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 109-55-7 | EEC No 203-680-9 | No 612-061-00-6

$CH_3 — N(CH_3) — CH_2 — CH_2 — NH_2$

N,N-dimetil-1,3-diaminopropano ; 3-(dimetilamino)propilamina

Clasificación,

R 10	Xn ; R 22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

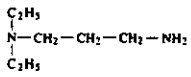
R : 10-22-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 104-78-9	EEC No 203-236-4	No 612-062-00-1



N,N-dietil-1,3-diaminopropano ; 3-(dietilamino)propilamina

Clasificación,

R 10	Xn ; R 21/22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

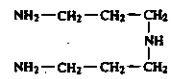
R : 10-21/22-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 56-18-8	EEC No 200-261-2	No 612-063-00-7



4-azaheptano-1,7-diamina ; dipropilentriamina

Clasificación,

Xn ; R 21/22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

R : 21/22-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 4067-16-7	EEC No 223-775-9	No 612-064-00-2

3,6,9,12-tetraazatetradecano-1,14-diamina ; pentaetilenhexamina

Clasificación,

C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

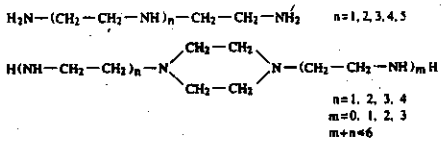
R : 34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No —	EEC No —	No 612-065-00-8



polietilenaminas

Clasificación,

Xn ; R 21/22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

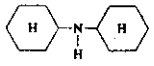
R : 21/22-34-43

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 101-83-7	EEC No 202-980-7	No 612-066-00-3



diciclohexilamina

Clasificación,

Xn ; R 22	C ; R 34

Etiquetado,

C

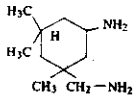
R : 22-34

S : (1/2-)36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 22-34
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34
2 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38

Cas No 2855-13-2	EEC No 220-666-8	No 612-067-00-9



3-aminometil-3,5,5-trimetilciclohexilamina ; isoforon de diamina

Clasificación,

Xn ; R 21/22	C ; R 34	R 43

Etiquetado,

C

R : 21/22-34-43

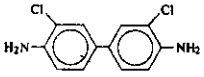
S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C ; R 21/22-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C ; R 34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xi ; R 36/38-43
1 % ≤ C < 5 %	Xi ; R 43

Cas No 91-94-1	EEC No 202-109-0	No 612-068-00-4

NOTA E



3,3'-diclorobencidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 21	R 43

Etiquetado,

T

R : 45-21-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 612-069-00-X

NOTA A

NOTA E

sales de 3,3'-diclorobencidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 21	R 43

Etiquetado,

T

R : 45-21-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 612-070-00-5

NOTA A
NOTA E

sales de bencidina

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 45-22
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 612-071-00-0

NOTA A
NOTA E

sales de 2-naftilamina

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

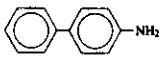
T

R : 45-22
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 92-67-1	EEC No 202-177-1	No 612-072-00-6

NOTA E



4-aminobifenilo

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado,

T

R : 45-22
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 612-073-00-1

NOTA A
NOTA E

sales de 4-aminobifenilo

Clasificación,

Carc. Cat. 1 ; R 45	Xn ; R 22

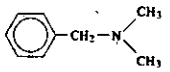
Etiquetado,

T

R : 45-22
S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 103-83-3 | EEC No 203-149-1 | No 612-074-00-7



bencildimetilamina

Clasificación,

R 10	Xn ; R 20/21/22	C ; R 34

Etiquetado,

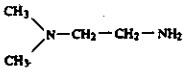
C

R : 10-20/21/22-34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 108-00-9 | EEC No 203-541-2 | No 612-075-00-2



2-aminoetildimetilamina ; 2-dimetilaminoetilamina

Clasificación,

F ; R 11	Xn ; R 21/22	C ; R 35

Etiquetado,

F C

R : 11-21/22-35

S : (1/2-)16-23-26-28-36-45

Límites de concentración,

Cas No 598-56-1 | EEC No 209-940-8 | No 612-076-00-8

$(CH_3)_2N - C_2H_5$

etildimetilamina

Clasificación,

F+ ; R 12	Xn ; R 20/22	C ; R 34

Etiquetado,

F+ C

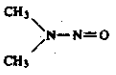
R : 12-20/22-34

S : (1/2-)3-16-26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 62-75-9 | EEC No 200-549-8 | No 612-077-00-3

NOTA E



dimetilnitrosamina ; N-nitrosodimetilamina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	T+ ; R 26	T ; R 25-48/25

Etiquetado,

T+

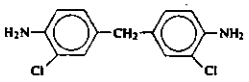
R : 45-25-26-48/25

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 101-14-4 | EEC No 202-918-9 | No 612-078-00-9

NOTA E



2,2'-dicloro-4,4'metilendianilina ; 4,4'-metilenbis(2-cloroanilina)

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado.

T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 612-079-00-4

NOTA A

NOTA E

sales de 2,2'-dicloro-4,4'-metilendianilina ; sales de 4,4'-metilenbis(2-cloroanilina)

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado.

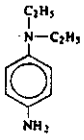
T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 93-05-0 | EEC No 202-214-1 | No 612-080-00-X



4-amino-N,N-dietilanilina ; N,N-dietil-p-fenilenodiamina

Clasificación.

T ; R 25	C ; R 34

Etiquetado.

T

R : 25-34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 612-081-00-5

NOTA A

NOTA E

sales de 3,3'-dimetilbencidina ; sales de o-tolidina

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22

Etiquetado.

T

R : 45-22

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 62-56-6	EEC No 200-543-5	No 612-082-00-0

tiourea ; tiocarbamida

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

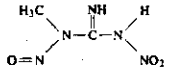
R : 22-40

S : (2-)22-24-36/37

Límites de concentración,

Cas No 70-25-7	EEC No 200-730-1	No 612-083-00-6

NOTA E



1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 20	Xi ; R 36/38

Etiquetado,

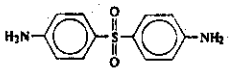
T

R : 45-20-36/38

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 80-08-0	EEC No 201-248-4	No 612-084-00-1



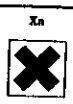
dapsona ; 4,4'-diaminodifenilsulfona ; 4,4'-sulfonildianilina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn



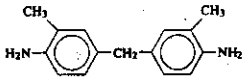
R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 838-88-0	EEC No 212-658-8	No 612-085-00-7

NOTA E



4,4'-metilendi-o-toluidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22	R 43

Etiquetado,

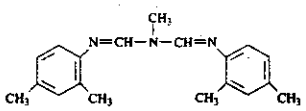
T

R : 45-22-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 33089-61-1 | EEC No 251-375-4 | No 612-086-00-2



amitraz (ISO) ; N,N-bis(2,4-xililiminometil) metilamina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

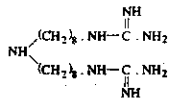
Xn

R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 13516-27-3 | EEC No 236-855-3 | No 612-087-00-8



guazatina (ISO) ; 1,1'-iminobis(octametilen)diguanidina

Clasificación,

Xn ; R 21/22 | Xi ; R 36/38

Etiquetado,

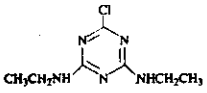
Xn

R : 21/22-36/38

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 122-34-9 | EEC No 204-535-2 | No 612-0[illegible]



simazina

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

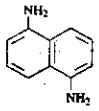
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 2243-62-1 | EEC No 218-817-8 | No 612-089-00-9



1,5-naftilenodiamina

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 1116-54-7	EEC No 214-237-4	No 612-090-00-4

$(HOCH_2CH_2)_2 — N — N = O$

2,2'-(nitrosoimino)bisetanol

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45

Etiquetado,

T

R : 45

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 95-53-4	EEC No 202-429-0	No 612-091-00-X

NOTA E

o-toluidina

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	T ; R 23/25	Xi ; R 36

Etiquetado,

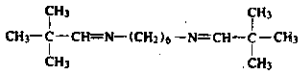
T

R : 45-23/25-36

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 1000-78-8	EEC No 401-660-6	No 612-092-00-5



N,N'-(2,2-dimetilpropiliden)hexametilendiamina

Clasificación,

Xi ; R 38	R 43

Etiquetado,

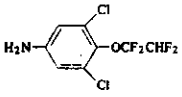
Xi

R : 38-43

S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 104147-32-2	EEC No 401-790-3	No 612-093-00-0



3,5-dicloro-4-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi)anilina

Clasificación,

Xn ; R 22	N ; R 50-53

Etiquetado,

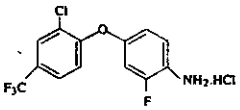
Xn N

R : 22-50/53

S : (2-)24/25-26-57-60-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 402-190-4	No 612-094-00-6



4-(2-cloro-4-trifluorometil)fenoxi-2-fluoroanilina, clorhidrato

Clasificación.

T; R 48/25	Xn; R 22	Xi; R 41	R 43	N; R 50-53

Etiquetado.

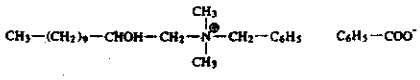
T N

R: 22-41-43-48/25-50/53

S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 113694-52-3	EEC No 402-610-6	No 612-095-00-1



benzoato de bencil-2-hidroxidodecildimetilamonio

Clasificación.

C; R 34	Xn; R 22	N; R 50-53

Etiquetado.

C N

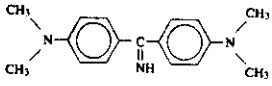
R: 22-34-50/53

S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración.

Cas No 492-80-8	EEC No 207-762-5	No 612-096-00-7

NOTA A



4,4'-carbonimidoilbis N,N-dimetilanilina

Clasificación.

Carc. Cat. 3; R 40	Xn; R 22	Xi; R 36

Etiquetado.

Xn

R: 22-36-40

S: (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No —	EEC No —	No 612-097-00-2

sales de 4,4'-carbonimidoilbis N,N-dimetilanilina

Clasificación.

Carc. Cat. 3; R 40	Xn; R 22	Xi; R 36

Etiquetado.

Xn

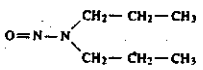
R: 22-36-40

S: (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 621-64-7 | EEC No 210-698-0 | No 612-098-00-8

NOTA E



nitrosodipropilamina

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	Xn; R 22

Etiquetado,

T

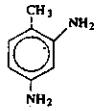
R: 45-22

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 95-80-7 | EEC No 202-453-1 | No 612-099-00-3

NOTA E



4-metil-m-fenilendiamina

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45	T; R 25	Xn; R 21	Xi; R 36	R 43

Etiquetado,

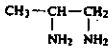
T

R: 45-21-25-36-43

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 78-90-0 | EEC No 201-155-9 | No 612-100-00-7



propilendiamina

Clasificación,

R 10	Xn; R 21/22	C; R 35

Etiquetado,

C

R: 10-21/22-35

S: (1/2-)26-37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 100-97-0 | EEC No 202-905-8 | No 612-101-00-2

metenamina

Clasificación,

F; R 11	R 42/43

Etiquetado,

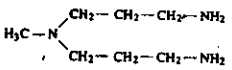
F Xn

R: 11-42/43

S: (2-)16-22-24-37

Límites de concentración,

Cas No 105-83-9 | EEC No 203-336-8 | No 612-102-00-8



N,N-bis(3-aminopropil)metilamina

Clasificación,

T; R 23/24	Xn; R 22	C; R 34

Etiquetado,

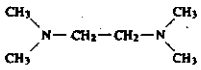
T

R: 22-23/24-34

S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 110-18-9 | EEC No 203-744-6 | No 612-103-00-3



N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

Clasificación,

F; R 11	Xn; R 20/22	C; R 34

Etiquetado,

F C

R: 11-20/22-34

S: (1/2-)16-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 124-09-4 | EEC No 204-679-6 | No 612-104-00-9

$H_2N-(CH_2)_6-NH_2$

hexametilendiamina

Clasificación,

Xn; R 21/22	Xi; R 37	C; R 34

Etiquetado,

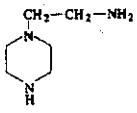
C

R: 21/22-34-37

S: (1/2-)22-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 140-31-8 | EEC No 205-411-0 | No 612-105-00-4



2-piperaxin-1-iletilamina

Clasificación,

Xn; R 21/22	C; R 34	R 43

Etiquetado,

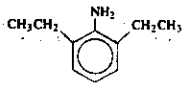
C

R: 21/22-34-43

S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 579-66-8 | EEC No 209-445-7 | No 612-106-00-X



2,6-dietilanilina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

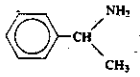
Xn

R : 22

S : (2-)23-34

Límites de concentración,

Cas No 618-36-0 | EEC No 210-545-8 | No 612-107-00-5



(dL)

DL--metilbencilamina

Clasificación,

Xn ; R 21/22 | C ; R 34

Etiquetado,

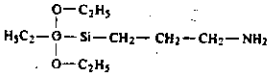
C

R : 21/22-34

S : (1/2-)26-28-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 919-30-2 | EEC No 213-048-4 | No 612-108-00-0



3-aminopropiltrietoxisilano

Clasificación,

Xn ; R 22 | C ; R 34

Etiquetado,

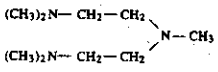
C

R : 22-34

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 3030-47-5 | EEC No 221-201-1 | No 612-109-00-6



bis(2-dimetilaminoetil)(metil)amina

Clasificación,

T ; R 24 | Xn ; R 22 | C ; R 34

Etiquetado,

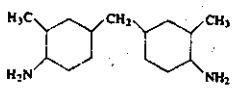
T

R : 22-24-34

S : (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 6864-37-5 | EEC No 229-962-1 | No 612-110-00-1

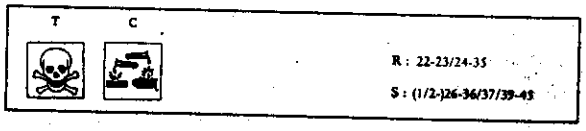


2,2'-dimetil-4,4'metilenbis(ciclohexilamina)

Clasificación.

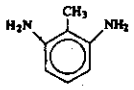
T; R 23/24	Xn; R 22	C; R 35

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 823-40-5 | EEC No 212-513-9 | No 612-111-00-7

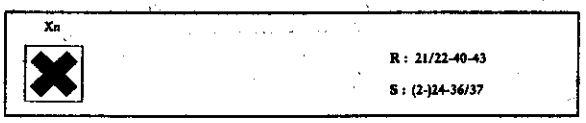


2-metil-*m*-fenilenodiamina

Clasificación.

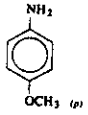
Muta. Cat. 3; R 40	Xn; R 21/22	R 43

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 104-94-9 (*p*) | EEC No 203-254-2 (p) | No 612-112-00-4

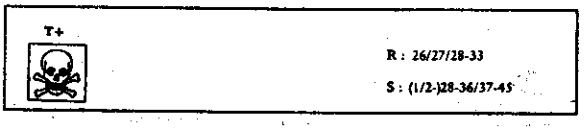


4-metoxianilina; *p*-anisidina

Clasificación.

T+; R 26/27/28	R 33

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 151-56-4 | EEC No 205-793-9 | No 613-001-00-1

NOTA D

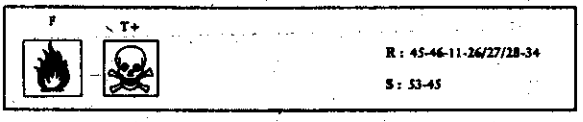
NOTA E

etilenimina; aziridina

Clasificación.

F; R 11	Carc. Cat. 2; R 45	Muta. Cat. 2; R 46	T+; R 26/27/28	C; R 34

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 110-86-1	EEC No 203-809-9	No 613-002-00-7

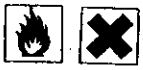
piridina

Clasificación.

F; R 11	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

F Xn



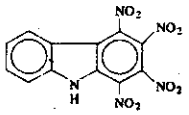
R: 11-20/21/22

S: (2-)26-28

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xn; R 20/21/22

Cas No 6202-15-9	EEC No —	No 613-003-00-2



1,2,3,4-tetranitrocarbazol

Clasificación.

E	R 1	Xn; R 20/21/22

Etiquetado.

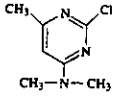
E Xn

R: 1-20/21/22

S: (2-)35

Límites de concentración.

Cas No 535-89-7	EEC No 208-622-6	No 613-004-00-8



crimidina (ISO); 2-cloro-6-metilpirimidin-4-ildimetilamina

Clasificación.

T+; R 28

Etiquetado.

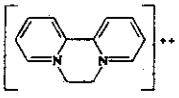
T

R: 28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 2764-72-9	EEC No 220-433-0	No 613-005-00-3



dicuat; ion; 1,1'-etilen-2,2'-bipiridilio

Clasificación.

T; R 24/25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

T

R: 24/25-36/37/38

S: (1/2-)22-36/37/39-45

Límites de concentración.

Cas No 4685-14-7 | EEC No 225-141-7 | No 613-006-00-9

paraquat (ISO); 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio

Clasificación.

T; R 24/25 | Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

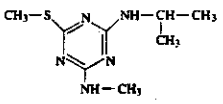
T

R: 24/25-36/37/38

S: (1/2-)22-36/37/39-45

Límites de concentración.

Cas No 1014-69-3 | EEC No 213-800-1 | No 613-007-00-4



desmetrina (ISO); 6-isopropilamino-2-metilamino-4-metiltio-1,3,5-triazina

Clasificación.

Xn; R 21/22

Etiquetado.

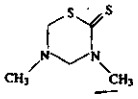
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 533-74-4 | EEC No 208-576-7 | No 613-008-00-X



dazomet (ISO); tetrahidro-3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazina-2-tiona

Clasificación.

Xn; R 22 | Xi; R 36

Etiquetado.

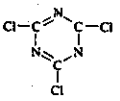
Xn

R: 22-36

S: (2-)15-22-24

Límites de concentración.

Cas No 108-77-0 | EEC No 203-614-9 | No 613-009-00-5



2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina; cloruro de cianurilo

Clasificación.

Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

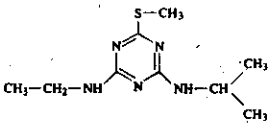
Xi

R: 36/37/38

S: (2-)28

Límites de concentración.

Cas No 834-12-8 | EEC No 212-634-7 | No 613-010-00-0



ametrina (ISO); 2-etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

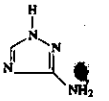
Xn

R: 22

S: (2-)36

Límites de concentración,

Cas No [illegible]-82-5 | EEC No 200-521-5 | No 613-011-00-6



amitrol (ISO); 1,2,4-triazol-3-ilamina

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40 | Xn; R 48/22

Etiquetado,

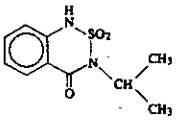
Xn

R: 40-48/22

S: (2-)36-37

Límites de concentración,

Cas No 25057-89-0 | EEC No 246-585-8 | No 613-012-00-1



bentazona (ISO); 2,2-dióxido de 3-isopropil-2,1,3-benzotiadiazina-4-ona

Clasificación,

Xn; R 22 | Xi; R 36

Etiquetado,

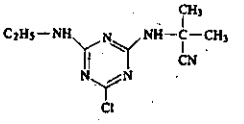
Xn

R: 22-36

S: (2-)26

Límites de concentración,

Cas No 21725-46-2 | EEC No 244-544-9 | No 613-013-00-7



cianazina (ISO); 2-(4-cloro-6-etilamino-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-metilpropionitrilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

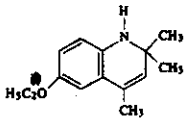
Xn

R: 22

S: (2-)37

Límites de concentración,

Cas No 91-53-2 | EEC No 202-075-7 | No 613-014-00-2



etoxiquina ; 6-etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinoleina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

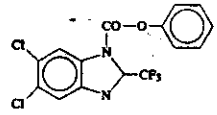
Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 14865-88-0 | EEC No 238-134-9 | No 613-015-00-8



fenazaflor (ISO) ; 5,6-dicloro-2-trifluorometilbencimidazol-1-carboxilato de fenilo

Clasificación,

Xn ; R 21/22

Etiquetado,

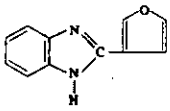
Xn

R : 21/22

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 3878-19-1 | EEC No 223-404-0 | No 613-016-00-3



fuberidazol ; 2-(2-furil)-bencimidazol

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

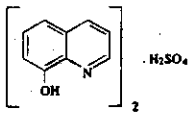
Xn

R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 134-31-6 | EEC No 205-137-1 | No 613-017-00-9



sulfato de bis(8-hidroxiquinolio) ; sulfato de 8-quinolinol

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

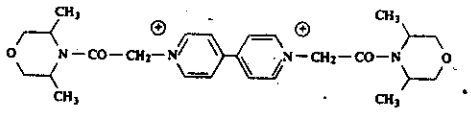
Xn

R : 22

S : (2-)36

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 613-018-00-4



moriamcuat (ISO); ion- 1,1'-bis(3,5-dimetilmorfolinocarbonilmetil)-4,4'-bipiridilio

Clasificación,

Xn; R 22 | Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

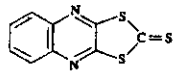
Xn

R: 22-36/37/38

S: (2-)22-36

Límites de concentración,

Cas Nº 93-75-4 | EEC No 202-272-8 | No 613-019-00-X



tioquinox; 1,3-ditiolo-4,5,b-quinoxalina-2-tiona

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

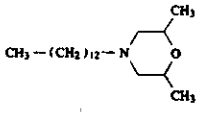
Xn

R: 22

S: (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 24602-86-6 | EEC No 246-347-3 | No 613-020-00-5



tridemorf (ISO); 2,6-dimetil-4-tridecilmorfolina

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

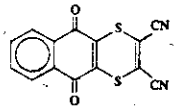
Xn

R: 21/22

S: (2-)25-36/37

Límites de concentración,

Cas No 3347-22-6 | EEC No 222-098-6 | No 613-021-00-0



ditianona (ISO); 5,10-dihidro-5,10-diononafto (2,3-b)(1,4)ditiazina 2,3-dicarbonitrilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

Xn

R: 22

S: (2-)24

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 613-022-00-6

piretrinas incluyendo las cinerinas

Clasificación.

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

Xn

R : 20/21/22

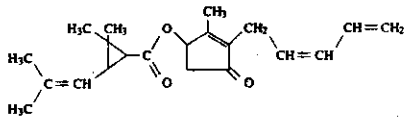
S : (2-)13

Límites de concentración.

Cas No 121-21-1

EEC No 204-455-8

No 613-023-00-1



piretrina I

Clasificación.

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

Xn

R : 20/21/22

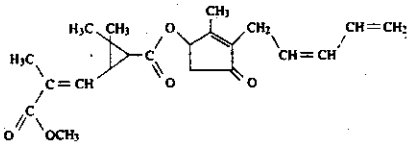
S : (2-)13

Límites de concentración.

Cas No 121-29-9

EEC No 204-462-6

No 613-024-00-7



piretrina II

Clasificación.

Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

Xn

R : 20/21/22

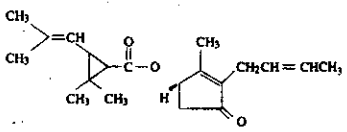
S : (2-)13

Límites de concentración.

Cas No 25402-06-6

EEC No 246-948-0

No 613-025-00-2



2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropanocarbozilato de 3-(but-2-enil)-2-metil-4-oxociclopent-2-enilo ; cinerina I

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

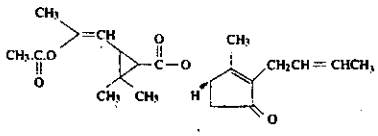
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 121-20-0	EEC No 204-454-2	No 613-026-00-8



2,2-dimetil-3-(3-metoxi-2-metil-3-oxoprop-1-enil)ciclopropánocarboxilato de 3-(but-2-enil)-2-metil-4-oxociclopent-2-enilo; cinerina II

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 110-89-4	EEC No 203-813-0	No 613-027-00-3

piperidina; hexahidropiridina

Clasificación.

F; R 11	T; R 23/24	C; R 34

Etiquetado.

F T

R: 11-23/24-34

S: (1/2-)16-26-27-45

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	T; R 23/24-34
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21-36/38

Cas No 110-91-8	EEC No 203-815-1	No 613-028-00-9

morfolina; tetrahidro-1,4-oxazina

Clasificación.

R 10	Xn; R 20/21/22	C; R 34

Etiquetado.

C

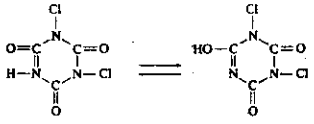
R: 10-20/21/22-34

S: (1/2-)23-36-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	C; R 20/21/22-34
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34
1 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/38

Cas No 2782-57-2	EEC No 220-487-5	No 613-029-00-4



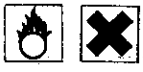
ácido dicloroisocianúrico; 1,3-dicloro-5H-1,3-5-triazinatrions

Clasificación.

O; R 8	Xn; R 22	R 31	Xi; R 36/37

Etiquetado.

O Xn

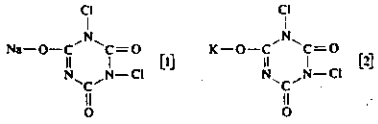


R: 8-22-31-36/37

S: (2-)8-26-41

Límites de concentración.

Cas No 2893-78-9 [1] 2244-21-5 [2]	EEC No 220-767-7 [1] 218-828-8 [2]	No 613-030-00-X



sal de sodio del ácido dicloroisocianúrico [1], sal de potasio del ácido dicloroisocianúrico [2]

Clasificación.

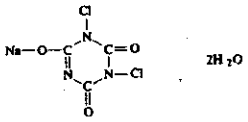
O; R 8	Xn; R 22	R 31	Xi; R 36/37

Etiquetado.

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xn; R 22-31-36/37

Cas No 51580-86-0	EEC No —	No 613-030-01-7



sal de sodio del ácido dicloroisocianúrico dihidratada

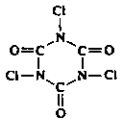
Clasificación.

Xn; R 22	R 31	Xi; R 36/37

Etiquetado.

Límites de concentración.

Cas No 87-90-1	EEC No 201-782-8	No 613-031-00-5

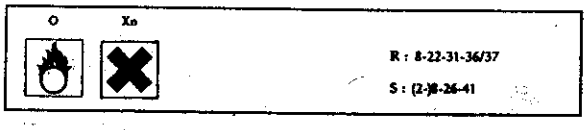


tricloro-1,3,5-triazinatriona; ácido tricloroisocianúrico

Clasificación.

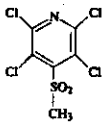
O; R 8	Xn; R 22	R 31	Xi; R 36/37

Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 131[illegible]-52-6	EEC No 236-035-5	No 613-032-00-0

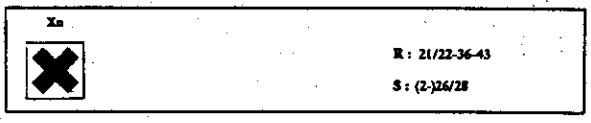


2,3,5,6-tetracloro-4-(metilsulfonil)piridina

Clasificación.

Xn; R 21/22	Xi; R 36	R 43

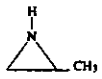
Etiquetado.



Límites de concentración.

Cas No 75-55-8	EEC No 200-878-7	No 613-033-00-6

NOTA E

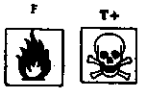


2-metilaziridina ; propilenimina

Clasificación.

F ; R 11	Carc. Cat. 2 ; R 45	T+ ; R 26/27/28	Xi ; R 41

Etiquetado.

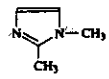


R : 45-11-26/27/28-41

S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 1739-34-0	EEC No 217-101-2	No 613-034-00-1



1,2-dimetilimidazol

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 38-41

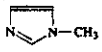
Etiquetado.

R : 22-38-41

S : (2-)24-26

Límites de concentración.

Cas No 616-47-7	EEC No 210-484-7	No 613-035-00-7



1-metilimidazol

Clasificación.

Xn ; R 21/22	C ; R 34

Etiquetado.

R : 21/22-34

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración.

Cas No 109-06-8	EEC No 203-643-7	No 613-036-00-2

2-metilpiridina ; 2-picolina

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20/21/22	Xi ; R 36/37

Etiquetado.

R : 10-20/21/22-36/37

S : (2-)26-36

Límites de concentración.

Cas No 108-89-4	EEC No 203-626-4	No. 613-037-00-8

4-metilpiridina ; 4-picolina

Clasificación,

R 10	T ; R 24	Xn ; R 20/22	Xi ; R 36/37/38

Etiquetado,

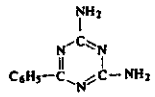
T

R : 10-20/22-24-36/37/38

S : (1/2-)26-36-45

Límites de concentración,

Cas No 91-76-9	EEC No 202-095-6	No 613-038-00-3

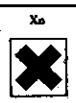


6-fenil-1,3,5-triazina-2,4-diamina ; benzoguanamina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,



Xn

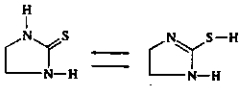
R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 96-45-7	EEC No 202-506-9	No 613-039-00-9

NOTA E



etilentiourea ; imidazolidina-2-tiona

Clasificación,

Repr. Cat. 2 ; R 61	Xn ; R 22

Etiquetado,

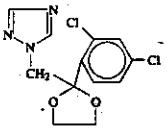
T

R : 61-22

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 60207-31-0	EEC No 262-102-3	No 613-040-00-4

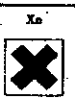


azaconazol (ISO) ; 1-[[2-(2,4-diclorofenil)-1,3-dioxolan-2-il]metil]-1H-1,2,4-triazol

Clasificación,

R 44	Xn ; R 22

Etiquetado,



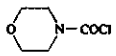
Xn

R : 22-44

S : (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 15159-40-7	EEC No 239-213-0	No 613-041-00-X



cloruro de morfolina-4-carbonilo

Clasificación.

R 14	Carc. Cat. 3 ; R 40	R 36/38

Etiquetado.

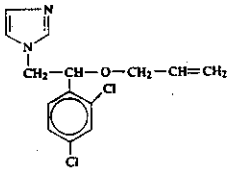
Xn

R : 14-36/38-40

S : (2-)26-30-36-38

Límites de concentración.

Cas No 35554-44-0	EEC No 252-615-0	No 613-042-00-5



1-[2-(aliloxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1*H*-imidazol

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado.

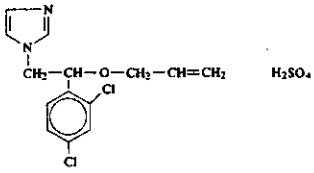
Xn

R : 22-36

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 58594-72-2	EEC No 261-351-5	No 613-043-00-0



hidrogenosulfato de 1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)]-1*H*-imidazolio

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 41

Etiquetado.

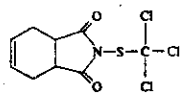
Xn

R : 22-41

S : (2-)26

Límites de concentración.

Cas No 133-06-2	EEC No 205-087-0	No 613-044-00-6



captan (ISO)

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xi ; R 36	R 43

Etiquetado.

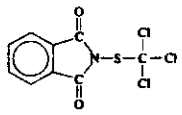
Xn

R : 36-40-43

S : (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No 133-07-3	EEC No 205-088-6	No 613-045-00-1



N-(triclorometiltio)ftalimida ; folpet

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xi ; R 36	R 43

Etiquetado,

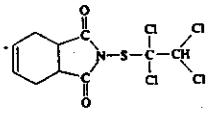
Xn

R : 36-40-43

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 2425-06-1	EEC No 219-363-3	No 613-046-00-7



captafol (ISO) ; 1,2,3,6-tetrahidro-N-(1,1,2,2-tetracloroetiltio)ftalimida

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	R 43

Etiquetado,

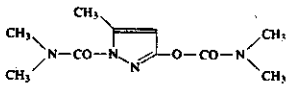
T

R : 45-43

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 644-64-4	EEC No 211-420-8	No 613-047-00-2



dimetilan (ISO) ; dimetilcarbamato de 1-dimetilcarbamoil-5-metilpirazol-3-ilo

Clasificación,

T ; R 25	Xn ; R 21

Etiquetado,

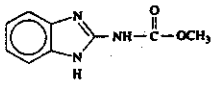
T

R : 21-25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 10605-21-7	EEC No 234-232-0	No 613-048-00-8



carbendazim (ISO) ; bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

Clasificación,

Muta. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

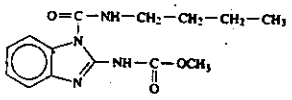
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 17804-35-2 | EEC No 241-775-7 | No 613-049-00-3



benomilo (ISO); 1-(butilcarbamoil)bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

Clasificación,

Muta. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

Xn

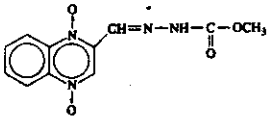
R: 40

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 6804-07-5 | EEC No 229-879-0 | No 613-050-00-9

NOTA 8



carbadox (DCI); 1,4-dióxido de 3-(quinoxalina-2-ilmetilen)carbazato de metil; 1,4-dióxido de 2-(metoxicarbonilhidrazonometil)quinoxalina

Clasificación,

F; R 11	Carc. Cat. 2; R 45	Xn; R 22

Etiquetado,

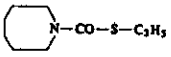
F T

R: 45-11-22

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 2212-67-1 | EEC No 218-661-0 | No 613-051-00-4



molinato (ISO); 1-perhidroazepinacarbotioato de S-etilo

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

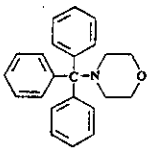
Xn

R: 22

S: (2-)24

Límites de concentración,

Cas No 1420-06-0 | EEC No 215-812-2 | No 613-052-00-X



trifenmorf (ISO); 4-tritilmorfolina

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

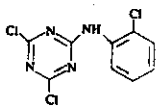
Xn

R: 22

S: (2-)22-24

Límites de concentración,

Cas No 101-05-3 | EEC No 202-910-5 | No 613-053-00-5



anilazina (ISO); 2-cloro-N-(4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-il)anilina

Clasificación,

Xi; R 36/38

Etiquetado,

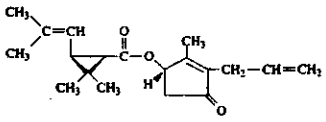
Xi

R: 36/38

S: (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 28434-00-6 | EEC No 249-013-5 | No 613-055-00-6



S-bioaletrina; (+)-trans-crisantemato de (S)-3-alil-2-metil-4-oxociclopent-2-enilo

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

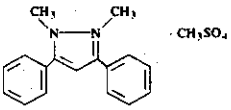
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 43222-48-6 | EEC No 256-152-5 | No 613-056-00-1



metilsulfato de 1,2-dimetil-3,5-difenilpirazolio

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

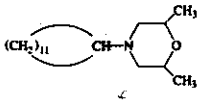
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 1593-77-7 | EEC No 216-474-9 | No 613-057-00-7



dodemorf (ISO); 4-ciclododecil-2,6-dimetilmorfolina

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

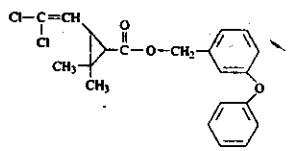
Xi

R: 36/37/38

S: (2)26

Límites de concentración,

Cas No 52645-53-1 | EEC No 258-067-9 | No 613-058-00-2



3-(2,2-diclorovinil)-2-dimetilciclopropanocarbamato de 3-fenoxibencilo ; permetrina*

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

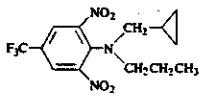
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 26399-36-0 | EEC No 247-656-6 | No 613-059-00-8



profluralin (ISO) ; N-(ciclopropilmetil) -alfa,alfa,alfa-trifluoro-2,6-dinitro-N-propil-p-toluidina

Clasificación,

Xi ; R 36

Etiquetado,

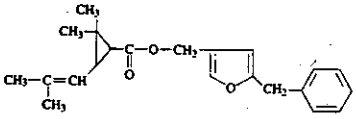
Xi

R : 36

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 10453-86-8 | EEC No 233-940-7 | No 613-060-00-3



resmetrina (ISO) ; (+-)-cis-trans-crisantemato de 5-bencil-3-furilmetilo

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración,

Cas No 15662-33-6 | EEC No 239-732-2 | No 613-061-00-9

pirrol-2-carboxilato de 6-(1-alfa,5a-beta,8a-beta,9-pentahidroxi-7-beta-isopropil-2-beta,5-beta,8-beta-trimetilperhidro-a 8b-alfa,9-epoxi-5,8-etanociclopenta(1,2-b)-indenilo) ; riania

Clasificación,

Xn ; R 21/22

Etiquetado,

Xn

R : 21/22

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 8051-02-3 | EEC No — | No 613-062-00-4

sabadilla (ISO); veratrina

Clasificación.

Xi; R 36/37/38

Etiquetado.

Xi

R: 36/37/38

S: (2-)36/37/39

Límites de concentración.

Cas No 26259-45-0 | EEC No 247-554-1 | No 613-063-00-X

secbumeton (ISO); 2-sec-butilamino-4-etilamino-6-metoxi-1,3,5-triazina

Clasificación.

Xn; R 22 | Xi; R 36

Etiquetado.

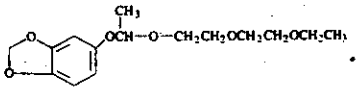
Xn

R: 22-36

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 51-14-9 | EEC No — | No 613-064-00-5



5-(3,6,9-trioxa-2-undeciloxi)benzo(d)-1,3-dioxolano

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

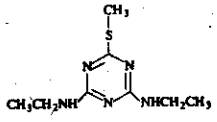
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 1014-70-6 | EEC No 213-801-7 | No 613-065-00-0



simetrina (ISO); 2,4-bis(etilamino)-6-metiltio-1,3,5-triazina

Clasificación.

Xn; R 22

Etiquetado.

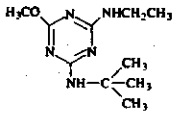
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración.

Cas No 33693-04-8 | EEC No 251-637-8 | No 613-066-00-6



terbumeton (ISO); 2-terc-butilamino-4-etilamino-6-metoxi-1,3,5-triazina

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

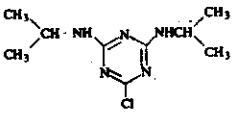
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 139-40-2 | EEC No 205-359-9 | No 613-067-00-1



propazina

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

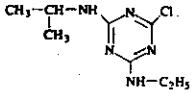
Xn

R: 40

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 1912-24-9 | EEC No 217-617-8 | No 613-068-00-7



atrazina

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40	Muta. Cat. 3; R 40	Xn; R 20/22	Xi; R 36	R 43

Etiquetado,

Xn

R: 20/22-36-40-43

S: (2-)36/37-46

Límites de concentración,

Cas No 105-60-2 | EEC No 203-313-2 | No 613-069-00-2

ε-caprolactama

Clasificación,

Xn; R 20/22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

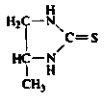
Xn

R: 20/22-36/37/38

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 2122-19-2 | EEC No — | No 613-070-00-8



propilentiourea

Clasificación,

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado,

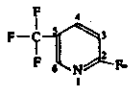
Xn

R : 40

S : (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 69045-82-5 | EEC No 400-290-2 | No 613-071-00-3



2-fluoro-5-trifluorometilpiridina

Clasificación,

R 10	R 43	R 52-53

Etiquetado,

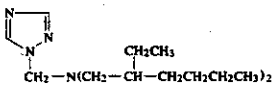
Xi

R : 10-43-52/53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 91273-04-0 | EEC No 401-280-0 | No 613-072-00-9



N,N-bis(2-etilhexil)-((1,2,4-triazol-1-il)metil)amina

Clasificación,

C ; R 34	R 43	N ; R 51-53

Etiquetado,

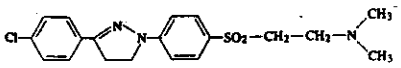
C N

R : 34-43-51/53

S : (1/2-)26-28-36/37/39-45-61

Límites de concentración,

Cas No 10357-99-0 | EEC No 401-410-6 | No 613-073-00-4



N,N-dimetil-2-(3-(4-clorofenil)-4,5-dihidropirazol-1-ilfenilsulfonil)etilamina

Clasificación,

Xn ; R 48/22	R 43	N ; R 51-53

Etiquetado,

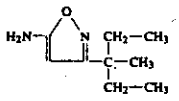
Xn N

R : 43-48/22-51/53

S : (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 82560-06-3 | EEC No 401-460-9 | No 613-074-00-X



3-(3-metilpent-3-il)isoxazol-5-ilamina

Clasificación,

T; R 23/25	Xi; R 41	R 52-53

Etiquetado,

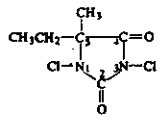
T

R: 23/25-41-52/53

S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61

Límites de concentración,

Cas No 89415-87-2 | EEC No 401-570-7 | No 613-075-00-5



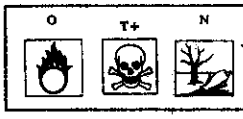
1,3-dicloro-5-etil-5-metilimidazolidina-2,4-diona

Clasificación,

O; R 8	T+; R 26	C; R 34	Xn; R 22	R 43	N; R 50

Etiquetado,

O T+ N

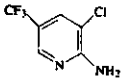


R: 8-22-26-34-43-50

S: (1/2-)8-26-36/39-45-61

Límites de concentración,

Cas No 79456-26-1 | EEC No 401-670-0 | No 613-076-00-0



3-cloro-5-trifluorometil-2-piridilamina

Clasificación,

Xn; R 22	R 52-53

Etiquetado,

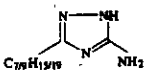
Xn

R: 22-52/53

S: (2-)61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 401-940-8 | No 613-077-00-6



Mezcla de,

5-heptil-1,2,4-triazol-3-ilamina

5-nonil-1,2,4-triazol-3-ilamina

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36	N; R 51-53

Etiquetado,

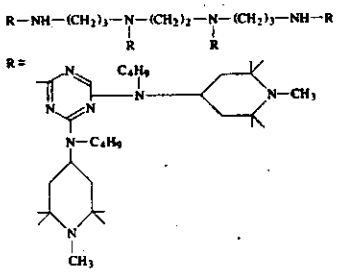
Xn N

R: 22-36-51/53

S: (2-)22-26-61

Límites de concentración,

Cas No 106990-43-6 | EEC No 401-990-0 | No 613-078-00-1



N,N',N'',N'''-tetrakis(4,6-bis(butil-(N-metil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)triazin-2-il)-4,7-diazadecan-o 1,10-diamina

Clasificación,

R 43	N ; R 51-53

Etiquetado,

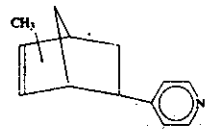
Xi N

R : 43-51/53

S : (2-)22-24-37-61

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No 402-520-7 | No 613-079-00-7



4-(1(o 4 o 5 o 6)-metil-8,9,10-trinorborn-5-en-2-il)piridina, mezcla de isómeros

Clasificación,

Xn ; R 21/22	Xi ; R 38	R 43	N ; R 50-53

Etiquetado,

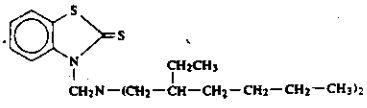
Xn N

R : 21/22-38-43-50/53

S : (2-)36/37-60-61

Límites de concentración,

Cas No 105254-85-1 | EEC No 402-540-6 | No 613-080-00-2



3-(bis(2-etilhexil)aminometil)benzotiazol-2(3H)-tiona

Clasificación,

C ; R 34	R 43	N ; R 50-53

Etiquetado,

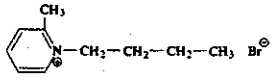
C N

R : 34-43-50/53

S : (1/2-)26-28-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 26576-84-1 | EEC No 402-680-8 | No 613-081-00-8



bromuro de 1-butil-2-metilpiridinio

Clasificación,

Xn ; R 22	R 52-53

Etiquetado,

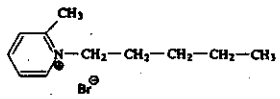
Xn

R : 22-52/53

S : (2-)61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 402-490-2	No 613-082-00-3



bromuro de 2-metil-1-pentilpiridinio

Clasificación,

Xn ; R 21/22	R 52/53

Etiquetado,

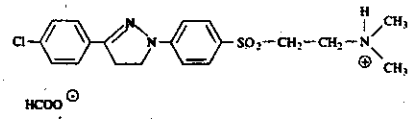
Xn

R : 21/22-52/53

S : (2-)36/37-61

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 402-120-2	No 613-083-00-9



formiato de 2-(4-(3-(4-clorofenil)-2-pirazolin-1-il)fenilsulfonil)etildimetilamonio

Clasificación,

C ; R 34	Xn ; R 48/22	R 43	N ; R 50-53

Etiquetado,

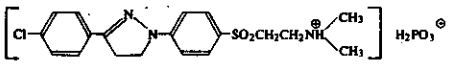
C N

R : 34-43-48/22-50/53

S : (1/2-)24-26-28-37/39-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 106359-93-7	EEC No 402-490-5	No 613-084-00-4



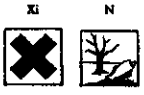
hidrógenofosfonato de 2-(4-(3-(4-clorofenil)-4,5-dihidropirazolil)fenilsulfonil)etildimetilamonio

Clasificación,

Xi ; R 36	N ; R 50-53

Etiquetado,

Xi N



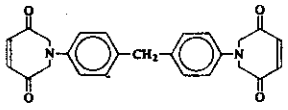
R : 36-50/53

S : (2-)26-60-61

Límites de concentración,

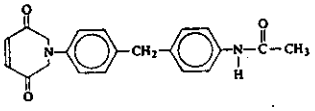
Cas No —	EEC No 401-970-1	No 613-085-00-X

Mezcla de,



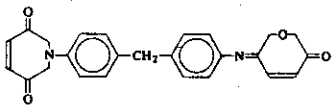
1,1'-(metilenbis(4,1-fenileno))dipirrol-2,5-diona

y,



N-(4-(4-(2,5-dioxopirrol-1-il)bencil)fenil)acetamida

y,



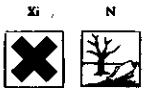
1-(4-(4-(5-oxo-2H-2-furilidenamino)bencil)fenil)pirrol-2,5-diona

Clasificación,

R 43	N ; R 50-53

Etiquetado,

Xi N

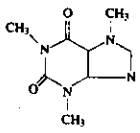


R : 43-50/53

S : (2-)24-37-60-61

Límites de concentración,

Cas No 58-08-2 | EEC No 200-362-1 | No 613-086-00-5



cafeína

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

T

R: 25

S: (1/2-)45

Límites de concentración,

Cas No 110-01-0 | EEC No 203-728-9 | No 613-087-00-0

tetrahidrotiofeno

Clasificación,

F; R 11 | Xn; R 20/21/22 | Xi; R 36/38

Etiquetado,

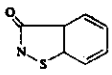
F Xn

R: 11-20/21/22-36/38

S: (2-)16-23-36/37

Límites de concentración,

Cas No 2634-33-5 | EEC No 220-120-9 | No 613-088-00-6



1,2-bencisotiazol-3(2H)-ona

Clasificación,

Xn; R 22 | Xi; R 38 | R 43

Etiquetado,

Xn

R: 22-38-43

S: (2)24-37

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 613-089-00-1

NOTA A

sales de dicyat

Clasificación,

T; R 24/25 | Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

T

R: 24/25-36/37/38

S: (1/2-)22-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 613-090-00-7

NOTA A

sales de paraquat

Clasificación,

T; R 24/25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

T

R: 24/25-36/37/38

S: (1/2-)22-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No —	No 613-091-00-2

NOTA A

sales de morfamquat

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

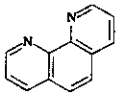
Xn

R: 22-36/37/38

S: (2-)22-36

Límites de concentración,

Cas No 66-71-7	EEC No 200-629-2	No 613-092-00-8



1,10-fenantrolina

Clasificación,

T; R 25

Etiquetado,

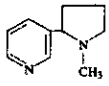
T

R: 25

S: (1/2-)45

Límites de concentración,

Cas No 54-11-5	EEC No 200-193-3	No 614-001-00-4



nicotina

Clasificación,

T+; R 27	T; R 25

Etiquetado,

T+

R: 25-27

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 614-002-00-X

NOTA A

sales de nicotina

Clasificación,

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado,

T+

R : 26/27/28

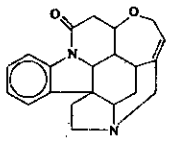
S : (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No 57-24-9

EEC No 200-319-7

No 614-003-00-3



estricnina

Clasificación,

T+ ; R 27/28

Etiquetado,

T+

R : 27/28

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No —

No 614-004-00-0

NOTA A

sales de estricnina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,

T+

R : 26/28

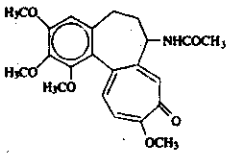
S : (1/2-)13-28-45

Límites de concentración,

Cas No 64-86-8

EEC No 200-598-5

No 614-005-00-6



colchicina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,

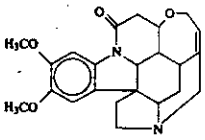
T+

R : 26/28

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 357-57-3 | EEC No 206-614-7 | No 614-006-00-1



brucina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,

T+

R : 26/28

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 614-007-00-7

NOTA A

sales de brucina

Clasificación.

T+ ; R 26/28

Etiquetado.

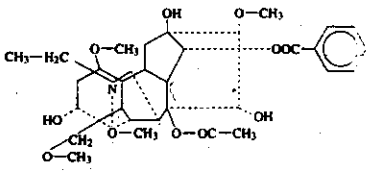
T+

R : 26/28

S : (1/2-)13-45

Límites de concentración,

Cas No 302-27-2 | EEC No 206-121-7 | No 614-008-00-2



aconitina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado.

T+

R : 26/28

S : (1/2-)24-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 614-009-00-8

NOTA A

sales de aconitina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,

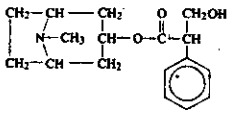
T+

R : 26/28

S : (1/2-)24-45

Límites de concentración,

Cas No 51-55-8 | EEC No 200-104-8 | No 614-010-00-3

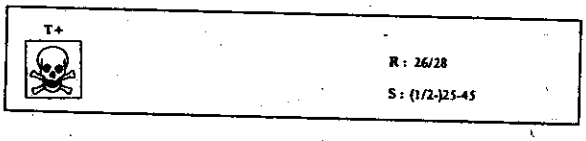


atropina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 614-011-00-9

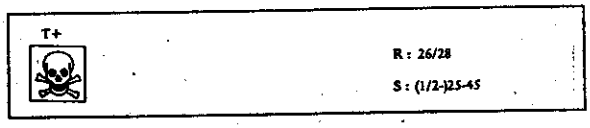
NOTA A

sales de atropina

Clasificación,

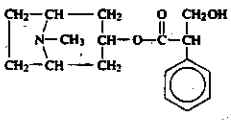
T+ ; R 26/28

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 101-31-5 | EEC No 202-933-0 | No 614-012-00-4

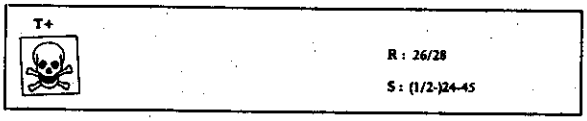


hiosciamina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 614-013-00-X

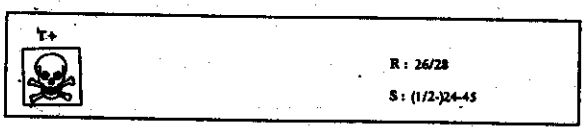
NOTA A

sales de hiosciamina

Clasificación,

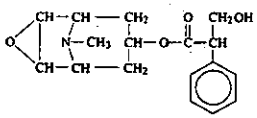
T+ ; R 26/28

Etiquetado,



Límites de concentración,

Cas No 51-34-3 | EEC No 200-090-3 | No 614-014-00-5



escopolamina

Clasificación.

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado.

T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)25-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 614-015-00-0

NOTA A

sales de escopolamina

Clasificación.

T+ ; R 26/27/28

Etiquetado.

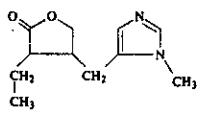
T+

R : 26/27/28

S : (1/2-)25-45

Límites de concentración.

Cas No 92-13-7 | EEC No 202-128-4 | No 614-016-00-6



pilocarpina

Clasificación.

T+ ; R 26/28

Etiquetado.

T+

R : 26/28

S : (1/2-)25-45

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 614-017-00-1

NOTA A

sales de pilocarpina

Clasificación.

T+ ; R 26/28

Etiquetado.

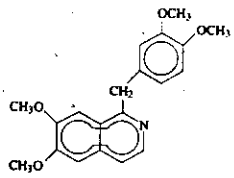
T+

R : 26/28

S : (1/2-)25-45

Límites de concentración.

Cas No 58-74-2 | EEC No 200-397-2 | No 614-018-00-7



papaverina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

Xn

R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 614-019-00-2

NOTA A

sales de papaverina

Clasificación,

Xn ; R 22

Etiquetado,

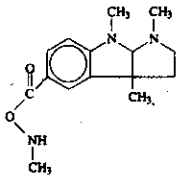
Xn

R : 22

S : (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 57-47-6 | EEC No 200-332-8 | No 614-020-00-8



fisostigmina ; eserina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,

T+

R : 26/28

S : (1/2-)25-45

Límites de concentración,

Cas No — | EEC No — | No 614-021-00-3

NOTA A

sales de fisostigmina ; sales de eserina

Clasificación,

T+ ; R 26/28

Etiquetado,

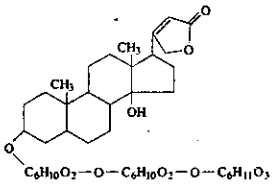
T+

R : 26/28

S : (1/2-)25-45

Límites de concentración,

Cas No 71-63-6 | EEC No 200-760-5 | No 614-022-00-9



digitoxina

Clasificación.

T; R 23/25	R 33

Etiquetado.

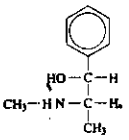
T

R : 23/25-33

S : (1/2-)45

Límites de concentración.

Cas No 299-42-3 | EEC No 206-080-5 | No 614-023-00-4



efedrina

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2-)22-25

Límites de concentración.

Cas No — | EEC No — | No 614-024-00-X

NOTA A

sales de efedrina

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

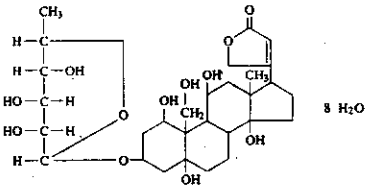
Xn

R : 22

S : (2-)22-25

Límites de concentración.

Cas No 630-60-4 | EEC No 211-139-3 | No 614-025-00-5



G-estrofantina

Clasificación.

T ; R 23/25	R 33

Etiquetado.

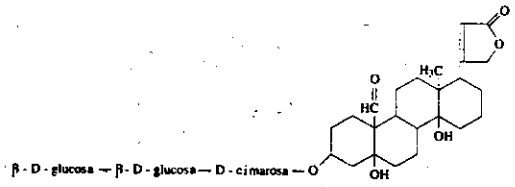
T

R : 23/25-33

S : (1/2-)45

Límites de concentración.

Cas No 11005-63-3	EEC No 234-239-9	No 614-026-00-0



K-estrofantina

Clasificación,

T; R 23/25	R 33

Etiquetado,

T

R : 23/25-33

S : (1/2-)45

Límites de concentración,

Cas No 507-60-8	EEC No 208-077-4	No 614-027-00-6

6ß-acetoxi-3 beta(ß-D-glucopiranosiloxi)8,14-dihidroxibufa-4,20,22-trienólido

Clasificación,

T+ ; R 28

Etiquetado,

T+

R : 28

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 624-83-9	EEC No 210-866-3	No 615-001-00-7

$CH_3 — N = C = O$

isocianato de metilo

Clasificación,

F+ ; R 12	T; R 23/24/25	Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

F+ T

R : 12-23/24/25-36/37/38

S : (1/2-)9-30-43-45

Límites de concentración,

Cas No 556-61-6	EEC No 209-132-5	No 615-002-00-2

$CH_3 — N = C = S$

isotiocianato de metilo

Clasificación,

T; R 23/25	C; R 34	R 43

Etiquetado,

T

R : 23/25-34-43

S : (1/2-)36/37-38-45

Límites de concentración,

Cas No 463-56-9	EEC No 207-337-4	No 615-003-00-8

HS—C≡N

ácido tiocianico; ácido sulfociánico

Clasificación.

Xn; R 20/21/22	R 32

Etiquetado.

Xn

R: 20/21/22-32

S: (2-)13

Límites de concentración.

Cas No —	EEC No —	No 615-004-00-3

NOTA A

tiocianatos; sulfocianatos

Clasificación.

Xn; R 20/21/22	R 32

Etiquetado.

Xn

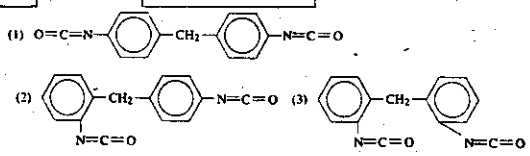
R: 20/21/22-32

S: (2-)13

Límites de concentración.

Cas No 101-68-8 [1] 5873-54-1 [2] 2536-05-2 [3]	EEC No 202-966-0 [1] 227-534-9 [2] 219-799-4 [3]	No 615-005-00-9

NOTA C



4,4'-diisocianato de difenilmetano [1], 2,4'-diisocianato de difenilmetano [2], 2,2'-diisocianato de difenilmetano [3]

Clasificación.

Xn; R 20	Xi; R 36/37/38	R 42

Etiquetado.

Xn

R: 20-36/37/38-42

S: (2-)26-28-38-45

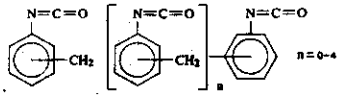
Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 25 %	Xn; R 20-36/37/38-42
5 % ≤ C < 25 %	Xn; R 36/37/38-42
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 42

Cas No 9016-87-9	EEC No —	No 615-005-01-6

NOTA C



diisocianato de difenilmetano, isómeros y homólogos

Clasificación.

Xn; R 20	Xi; R 36/37/38	R 42

Etiquetado.

Xn

R: 20-36/37/38-42

S: (2-)26-28-38-45

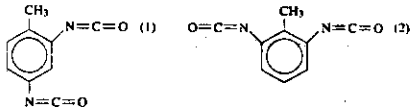
Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 25 %	Xn; R 20-36/37/38-42
5 % ≤ C < 25 %	Xn; R 36/37/38-42
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 42

Cas No 584-84-9 [1] 91-08-7 [2]	EEC No 209-544-5 [1] 202-039-0 [2]	No 615-006-00-4

NOTA C



2,4-diisocianato de tolueno [1], 2,6-diisocianato de tolueno [2]

Clasificación.

T; R 23	Xi; R 36/37/38	R 42

Etiquetado.

R: 23-36/37/38-42

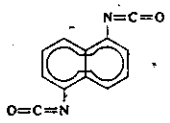
S: (1/2-)23-26-28-38-45

Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 20 %	T; R 23-36/37/38-42
2 % ≤ C < 20 %	T; R 23-42
0,5 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20-42

Cas No 3173-72-6	EEC No 221-641-4	No 615-007-00-X



diisocianato de 1,5-naftileno

Clasificación.

Xn; R 20	Xi; R 36/37/38	R 42

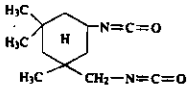
Etiquetado.

R: 20-36/37/38-42

S: (2-)26-28-38-45

Límites de concentración.

Cas No 4098-71-9	EEC No 223-861-6	No 615-008-00-5



3-isocianometil-3,5,5-trimetilciclohexilisocianato

Clasificación.

T; R 23	Xi; R 36/37/38	R 42/43

Etiquetado.

R: 23-36/37/38-42/43

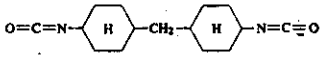
S: (1/2-)26-28-38-45

Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 20 %	T; R 23-36/37/38-42/43
2 % ≤ C < 20 %	T; R 23-42/43
0,5 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20-42/43

Cas No 5124-30-1	EEC No 225-863-2	No 615-009-00-0



diisocianato de 4,4'-diciclohexilmetano

Clasificación.

T; R 23	Xi; R 36/37/38	R 42/43

Etiquetado.

R: 23-36/37/38-42/43

S: (1/2-)26-28-38-45

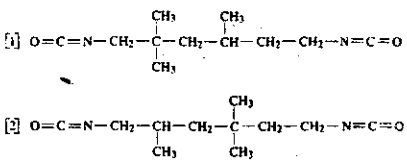
Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 20 %	T; R 23-36/37/38-42/43
2 % ≤ C < 20 %	T; R 23-42/43
0,5 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20-42/43

Cas No 16938-22-0 [1] 15646-96-5 [2]	EEC No 241-081-8 [1] 239-714-4 [2]	No 615-010-00-6

NOTA C



diisocianato de 2,2,4-trimetil-1,6-hexametileno [1], diisocianato de 2,4,4-trimetil-1,6-hexametileno [2]

Clasificación.

T; R 23	Xi; R 36/37/38	R 42

Etiquetado.

T

R: 23-36/37/38-42

S: (1/2-)26-28-38-45

Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 20 %	T; R 23-36/37/38-42
2 % ≤ C < 20 %	T; R 23-42
0,5 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20-42

Cas No 822-06-0	EEC No 212-485-8	No 615-011-00-1

1,6-diisocianato de hexametileno

Clasificación.

T; R 23	Xi; R 36/37/38	R 42/43

Etiquetado.

T

R: 23-36/37/38-42/43

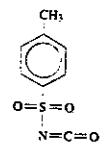
S: (1/2-)26-28-38-45

Límites de concentración.

NOTA 2

C ≥ 20 %	T; R 23-36/37/38-42/43
2 % ≤ C < 20 %	T; R 23-42/43
0,5 % ≤ C < 2 %	Xn; R 20-42/43

Cas No 4083-64-1	EEC No 223-810-8	No 615-012-00-7



4-isocianato de sulfoniltolueno; toxilisocianato

Clasificación.

R 14	Xi; R 36/37/38	R 42

Etiquetado.

Xn

R: 14-36/37/38-42

S: (2-)26-28-30

Límites de concentración.

C ≥ 5 %	Xn; R 36/37/38-42
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 42

Cas No 420-04-2 (I) 156-62-7 (II)	EEC No 206-992-3	No 615-013-00-2

cianamida; carbamonitril

Clasificación.

T; R 25	Xn; R 21	Xi; R 36/38	R 43

Etiquetado.

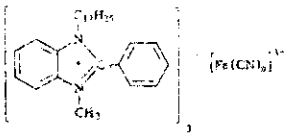
T

R: 21-25-36/38-43

S: (1/2-)3-22-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 7276-58-6 | EEC No — | No 615-014-00-8



hexacianoferrato de tris(1-dodecil-2-fenil-2 metilbenzimidazolio)

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

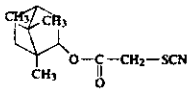
Xn

R : 22

S : (2-)24

Límites de concentración.

Cas No 115-31-1 | EEC No 204-081-5 | No 615-015-00-3



tiocianatoacetato de 1,7,7-trimetilbiciclo(2,2,1)hept-2-ilo

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2-)24/25

Límites de concentración.

Cas No 590-28-3 | EEC No 209-576-2 | No 615-016-00-9

KOCN

cianato de potasio

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2-)24/25

Límites de concentración.

Cas No 156-62-7 | EEC No 205-861-8 | No 615-017-00-4

$Ca^{++}\{-N=C=N-\}$

cianamida cálcica

Clasificación.

Xn ; R 22 | Xi ; R 37-41

Etiquetado.

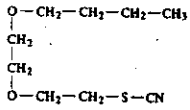
Xn

R : 22-37-41

S : (2-)22-26-36/37/39

Límites de concentración.

Cas No 112-56-1	EEC No 203-985-7	No 615-018-00-X



tiocianato de 2-(2-butoxietoxi)etilo

Clasificación.

R 10	T; R 24/25

Etiquetado.

T

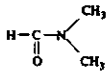
R: 10-24/25

S: (1/2-)13-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 68-12-2	EEC No 200-679-5	No 616-001-00-X

NOTA E



N,N-dimetilformamida

Clasificación.

Repr. Cat. 2; R 61	Xn; R 20/21	Xi; R 36

Etiquetado.

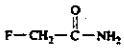
T

R: 61-20/21-36

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 640-19-7	EEC No 211-363-1	No 616-002-00-5



2-fluoroacetamida

Clasificación.

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado.

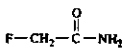
T+

R: 24-28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 640-19-7	EEC No 211-363-1	No 616-002-00-5



2-fluoroacetamida

Clasificación.

T+; R 28	T; R 24

Etiquetado.

T+

R: 24-28

S: (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 79-06-1	EEC No 201-173-7	No 616-003-00-0

NOTA D
NOTA E

$CH_2 = CH - CONH_2$

acrilamida

Clasificación.

Carc. Cat. 2 ; R 45	Muta. Cat. 2 ; R 46	T ; R 24/25-48/23/24/25

Etiquetado.

T

R : 45-46-24/25-48/23/24/25
S : 53-45

Límites de concentración.

Cas No 93-71-0	EEC No 202-270-7	No 616-004-00-6

$(CH_2{=}CH{-}CH_2)_2N{-}CO{-}CH_2Cl$

alidocloro (ISO) ; N,N-dialilcloroacetamida

Clasificación.

Xn ; R 21/22	Xi ; R 36/38

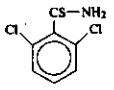
Etiquetado.

Xn

R : 21/22-36/38
S : (2-)26-28-36/37/39

Límites de concentración.

Cas No 1918-13-4	EEC No 217-637-7	No 616-005-00-1



clortiamida (ISO) ; 2,6-dicloro(tiobenzamida)

Clasificación.

Xn ; R 22

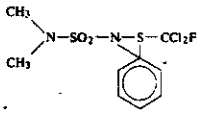
Etiquetado.

Xn

R : 22
S : (2-)36

Límites de concentración.

Cas No 1085-98-9	EEC No 214-118-7	No 616-006-00-7



diclofluanida (ISO) ; N-diclorofluorometiltio-N-fenil-N',N'-dimetilsulfamida

Clasificación.

Xi ; R 36	R 43	N ; R 50-53

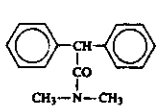
Etiquetado.

Xi N

R : 36-43-50/53
S : (2-)22-24-60-61

Límites de concentración.

Cas No 957-51-7 | EEC No 213-482-4 | No 616-007-00-2



difenamida (ISO); 2,2-difenil-N,N-dimetilacetamida

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

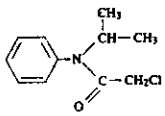
Xn

R: 22

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 1918-16-7 | EEC No 217-658-2 | No 616-008-00-8



propacloro; *N*-isopropil-*N*-fenil-2-cloroacetamida

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36	R 43

Etiquetado,

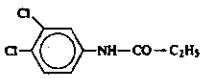
Xn

R: 22-36-43

S: (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No 709-98-8 | EEC No 211-914-6 | No 616-009-00-3



propanil (ISO); 3',4'-dicloropropionanilida

Clasificación,

Xn; R 22

Etiquetado,

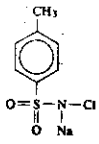
Xn

R: 22

S: (2-)22

Límites de concentración,

Cas No 127-65-1 | EEC No 204-854-7 | No 616-010-00-9



N-cloro-p-toluensulfonamide; cloramina T (sal de sodio)

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

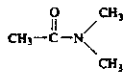
Xi

R: 36/37/38

S: (2-)7-15

Límites de concentración,

Cas No 127-19-5	EEC No 204-826-4	No 616-011-00-4



N,N-dimetilacetamida

Clasificación,

Xn ; R 20/21	Xi ; R 36

Etiquetado,

Xn

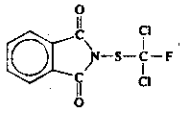
R : 20/21-36

S : (2-)26-28-36

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	Xn ; R 20/21-36
12,5 % ≤ C < 20 %	Xn ; R 20/21

Cas No 719-96-0	EEC No 211-952-3	No 616-012-00-X



N-(diclorofluorometiltio)ftalimida

Clasificación,

Xi ; R 38

Etiquetado,

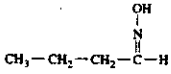
Xi

R : 38

S : (2-)28

Límites de concentración,

Cas No 110-69-0	EEC No 203-792-8	No 616-013-00-5



butiraldehído-oxima

Clasificación,

T ; R 24	Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado,

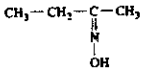
T

R : 22-24-36

S : (1/2-)23-36-45

Límites de concentración,

Cas No 96-29-7	EEC No 202-496-6	No 616-014-00-0



2-butanona-oxima

Clasificación,

Xi ; R 36	R 43

Etiquetado,

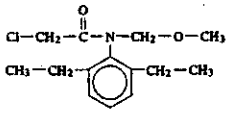
Xi

R : 36-43

S : (2-)23-24

Límites de concentración,

Cas No 15972-60-8 | EEC No 240-110-8 | No 616-015-00-6



alacloro (ISO); 2-cloro-2',6'-dietil-N-(metoximetil)acetanilida

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40	Xn; R 22	R 43

Etiquetado,

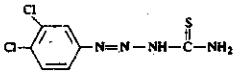
Xn

R: 22-40-43

S: (2-)36/37/39

Límites de concentración,

Cas No 5836-73-7 | EEC No — | No 616-016-00-1



1-(3,4-diclorofenilimino) tiosemicarbazida; promurit

Clasificación,

T+; R 28

Etiquetado,

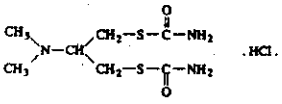
T+

R: 28

S: (1/2-)22-36/37-45

Límites de concentración,

Cas No 15263-52-2 | EEC No 239-309-2 | No 616-017-00-7



clorhidrato de cartap

Clasificación,

Xn; R 21/22

Etiquetado,

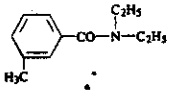
Xn

R: 21/22

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 134-62-3 | EEC No 205-149-7 | No 616-018-00-2



N,N-dietil-m-toluamida

Clasificación,

Xn; R 22	Xi; R 36/38

Etiquetado,

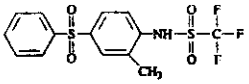
Xn

R: 22-36/38

S: (2)

Límites de concentración,

Cas No 37924-13-3 | EEC No 253-718-3 | No 616-019-00-8



1,1,1-trifluoro-N-(4-fenilsulfonil-o-tolil)metanosulfonamida ; perfluidona

Clasificación.

Xn ; R 22 | Xi ; R 36

Etiquetado.

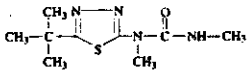
Xn

R : 22-36

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 34014-18-1 | EEC No 251-793-7 | No 616-020-00-3



tebuthiuron (ISO) ; 1-(5-terc-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilurea

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

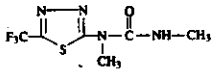
Xn

R : 22

S : (2-)37

Límites de concentración.

Cas No 25366-23-8 | EEC No 246-901-4 | No 616-021-00-9



tiazfluron (ISO) ; 1,3-dimetil-1-(5-trifluorometil-1,3,4-tiadiazol-2-il)urea

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 60-35-5 | EEC No 200-473-5 | No 616-022-00-4

acetamida

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40

Etiquetado.

Xn

R : 40

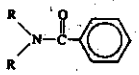
S : (2-)36/37

Límites de concentración.

Cas No —

EEC No 401-900-6

No 616-023-00-X



R = C16, C18

N-hexadecil(o octadecil)-N-hexadecil(o octadecil)benzamida

Clasificación,

Xi ; R 38	R 43

Etiquetado,

Xi

R : 38-43

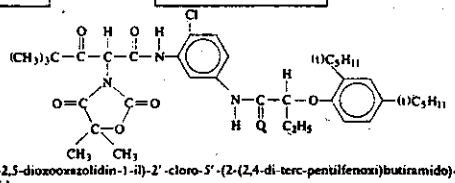
S : (2-)24-37

Límites de concentración,

Cas No —

EEC No 402-260-4

No 616-024-00-5



2-(4,4-dimetil-2,5-dioxooxazolidin-1-il)-2' -cloro-5' -(2-(2,4-di-terc-pentilfenoxi)butiramido)-4,4-dimetil-3-oxovaleranilida

Clasificación,

E ; R 2	R 53

Etiquetado,

E

R : 2-53

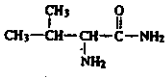
S : (2-)61

Límites de concentración,

Cas No 20108-78-5

EEC No 402-840-7

No 616-025-00-0



valinamida

Clasificación,

Xi ; R 36	R 43

Etiquetado,

Xi

R : 36-43

S : (2-)24-26-37

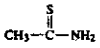
Límites de concentración,

Cas No 62-55-5

EEC No 200-541-4

No 616-026-00-6

NOTA E



tioacetamida

Clasificación,

Carc. Cat. 2 ; R 45	Xn ; R 22	Xi ; R 36/38

Etiquetado,

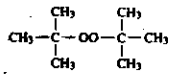
T

R : 45-22-36/38

S : 53-45

Límites de concentración,

Cas No 110-05-4 | EEC No 203-733-6 | No 617-001-00-2



peróxido de di-*terc*-butilo

Clasificación,

O; R 7	F; R 11

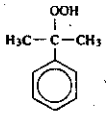
Etiquetado,

R: 7-11

S: (2-)3/7-14-16-36/37/39

Límites de concentración,

Cas No 80-15-9 | EEC No 201-254-7 | No 617-002-00-8

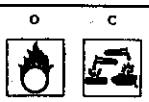


hidroperóxido de α-α-dimetilbenceno; hidroperóxido de cumeno 80 %

Clasificación,

O; R 7	C; R 34	Xn; R 20/22

Etiquetado,



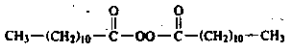
R: 7-20/22-34

S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45-50

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 20/22-34
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 105-74-8 | EEC No 203-326-3 | No 617-003-00-3

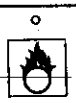


peróxido de dilauroilo

Clasificación,

O; R 7

Etiquetado,

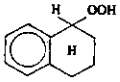


R: 7

S: (2-)3/7-14-36-37/39

Límites de concentración,

Cas No 771-29-9 | EEC No 212-230-0 | No 617-004-00-9



hidroperóxido de 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo; hidroperóxido de tetralina

Clasificación,

O; R 7	C; R 34	Xn; R 22

Etiquetado,

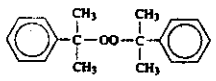
R: 7-22-34

S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	C; R 22-34
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 80-43-3	EEC No 201-279-3	No 617-006-00-X



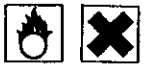
peróxido de bis(α,α-dimetilbencilo); peróxido de di-α-cumilo

Clasificación,

O; R 7	Xi; R 36/38

Etiquetado,

O Xi

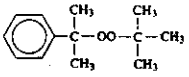


R: 7-36/38

S: (2-)3/7-14-36/37/39

Límites de concentración,

Cas No 3457-61-2	EEC No 222-389-8	No 617-007-00-5



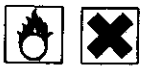
peróxido de *tere*-butilo y de α,α-dimetilbencilo

Clasificación,

O; R 7	Xi; R 38

Etiquetado,

O Xi

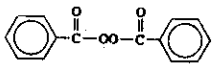


R: 7-38

S: (2-)3/7-14-36/37/39

Límites de concentración,

Cas No 94-36-0	EEC No 202-327-6	No 617-008-00-0



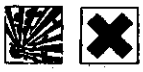
peróxido de dibenzoilo

Clasificación,

E; R 2	O; R 7	Xi; R 36	R 43

Etiquetado,

E Xi



R: 2-7-36-43

S: (2-)3/7-14-36/37/39

Límites de concentración,

Cas No 8050-09-7	EEC No 232-475-7	No 650-015-00-7

colofonia

Clasificación,

R 42/43

Etiquetado,

Xn

R: 42/43

S: (2-)22-23-24-37

Límites de concentración,

Cas No —	EEC No 401-770-4	No 650-014-00-1

2,4-dihidroxiciclodisiloxano-2,4-diilbis(trimetileno)difosfonato de dietilo, sal de tetrasodio, productos de reacción con metasilicato de disodio

Clasificación,

C; R 34	Xn; R 22

Etiquetado,

C

R: 22-34

S: (1/2-)26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 12510-42-8	EEC No —	No 650-012-00-0

erionita

Clasificación,

Carc. Cat. 1; R 45

Etiquetado,

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 132207-33-1 132207-32-0 12172-73-5 77536-66-4 77536-68-6 77536-67-5	EEC No —	No 650-013-00-6

NOTA E

amianto

Clasificación,

Carc. Cat. 1; R 45	T; R 48/23

Etiquetado,

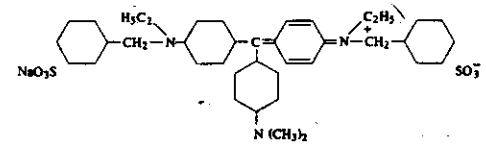
T

R: 45-48/23

S: 53-45

Límites de concentración,

Cas No 1694-09-3	EEC No 216-901-9	No 650-010-00-X



benzyl violet 4B; alfa-[4-(4-dimetilamino-alfa-[4-[etil(3-sodiosulfonatobencil)amino] fenil]bencilideno)ciclohexa-o 2,5-dieniliden(etil)ammonio]tolueno-3-sulfonato

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40

Etiquetado,

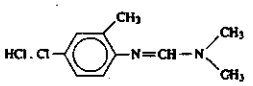
Xn

R: 40

S: (2-)36/37

Límites de concentración,

Cas No 19750-95-9 | EEC No 243-269-1 | No 650-009-00-4



clordimeform, clorhidrato ; N^2-(4-cloro-o-tolil)-N^1,N^1-dimetilformamidina, clorhidrato

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 22

Etiquetado.

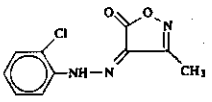
Xn

R : 22-40

S : (2-)22-36/37

Límites de concentración.

Cas No 5707-69-7 | EEC No 227-197-8 | No 650-008-00-9



drazoxolon (ISO) ; 4-(2-clorofenilhidrazon)-3-metil-5-isoxazolona

Clasificación.

T ; R 25

Etiquetado.

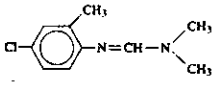
T

R : 25

S : (1/2-)22-24-36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 6164-98-3 | EEC No 228-200-5 | No 650-007-00-3



clordimeform (ISO) ; N^2-(4-cloro-o-tolil)-N^1,N^1-dimetilformamidina

Clasificación.

Carc. Cat. 3 ; R 40	Xn ; R 21/22

Etiquetado.

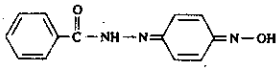
Xn

R : 21/22-40

S : (2-)22-36/37

Límites de concentración.

Cas No 495-73-8 | EEC No 207-807-9 | No 650-006-00-8



benquinox (ISO) ; p-benzoquinona-1-benzoilhidrazona-4-oxima

Clasificación.

T ; R 25	Xn ; R 21

Etiquetado.

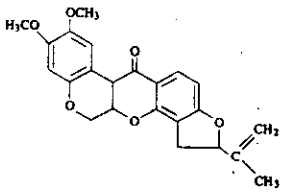
T

R : 21-25

S : (1/2-)36/37-45

Límites de concentración.

Cas No 83-79-4 | EEC No 201-501-9 | No 650-005-00-2



rotenona

Clasificación.

T ; R 25	Xi ; R 36-37-38

Etiquetado.

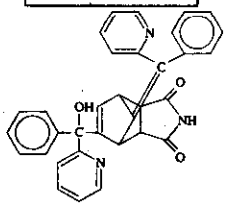
T

R : 25-36/37/38

S : (1/2-)22-24/25-36-45

Límites de concentración.

Cas No 991-42-4 | EEC No 213-589-6 | No 650-004-00-7



norbormida (ISO) ; 5-(α-hidroxi-α-2-piridilbencil)-7-(α-2-piridilbenciliden)biciclo[2.2.1]hep-5-eno-2,3-dicarboximida

Clasificación.

Xn ; R 22

Etiquetado.

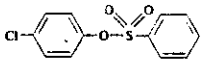
Xn

R : 22

S : (2)

Límites de concentración.

Cas No 80-38-6 | EEC No 201-274-6 | No 650-003-00-1



fenson ; bencenosulfonato de 4-clorofenilo

Clasificación.

Xn ; R 22	Xi ; R 36

Etiquetado.

Xn

R : 22-36

S : (2-)24-26

Límites de concentración.

Cas No 8006-64-2 (mix.) | EEC No 232-350-7 | No 650-002-00-6

aguarrás ; esencia de trementina

Clasificación.

R 10	Xn ; R 20/21/22

Etiquetado.

Xn

R : 10-20/21/22

S : (2)

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	Xn ; R 20/21/22

Cas No — | EEC No 400-160-5 | No 649-007-00-6

ácidos grasos, aceite de resina, productos de reacción con iminodietanol y ácido bórico

Clasificación.

Xi; R 38 | N; R 51-53

Etiquetado.

Xi N

R: 38-51/53

S: (2-)28-37-61

Límites de concentración.

Cas No 97722-04-8 | EEC No 307-753-7 | No 649-006-00-0

hidrocarburos, C26-55, ricos en aromáticos

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 91995-78-7 | EEC No 295-341-7 | No 649-005-00-5

extractos (petróleo), disolvente de gasóleo ligero obtenido a vacío

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 64742-11-6 | EEC No 265-111-0 | No 649-004-00-X

extractos (petróleo), destilado nafténico pesado estraído con disolvente

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 64742-05-8 | EEC No 265-104-2 | No 649-003-00-4

extractos (petróleo), destilado parafínico ligero ligero estraído con disolvente

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 64742-04-7 | EEC No 265-103-7 | No 649-002-00-9

extractos (petróleo), destilado parafínico pesado estraído con disolvente

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45

Etiquetado.

T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 64742-03-6 | EEC No 265-102-1 | No 649-001-00-3

extractos (petróleo), destilado nafténico ligero estraído con disolventes

Clasificación.

Carc. Cat. 2: R 45

Etiquetado.

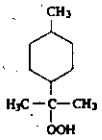
T

R: 45

S: 53-45

Límites de concentración.

Cas No 80-47-7 | EEC No 201-281-4 | No 617-012-00-2



hidroperóxido de 8-*p*-mentilo

Clasificación.

O; R 7 | C; R 34 | Xn; R 20

Etiquetado.

O C

R: 7-20-34

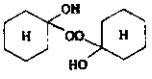
S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	C; R 20-34
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/37/38

Cas No 12262-58-7 | EEC No 235-527-7 | No 617-010-00-1

NOTA C



peróxido de bis(1-hidroxiciclohexilo); peróxido de ciclohexanona, mezcla

Clasificación.

E: R 2 | O; R 7 | C; R 34 | Xn; R 22

Etiquetado.

E C

R: 2-7-22-34

S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	C; R 22-34
10 % ≤ C < 25 %	C; R 34
5 % ≤ C < 10 %	Xi; R 36/37/38

ANEXO II

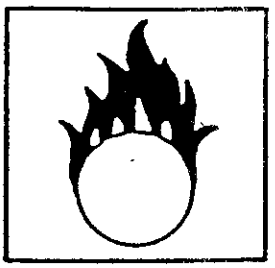
Símbolos e indicaciones de peligro de las sustancias y preparados peligrosos.

Nota: Las letras E, O, F, F+, T, T+ ,C ,X_n , X_i , y N no forman parte del símbolo.

E

Explosivo

O



Comburente

F

Fácilmente inflamable

F+

Extremadamente inflamable

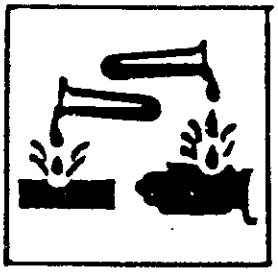
T

Tóxico

T+

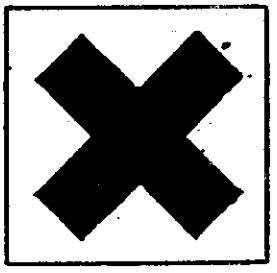
Muy Tóxico

C



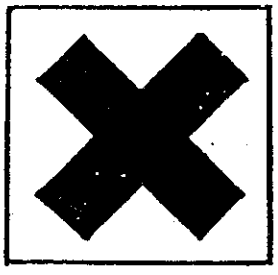
Corrosivo

X_n



Nocivo

X_i



Irritante

N

Peligroso para el medio ambiente

ANEXO III

Naturaleza de los riesgos específicos atribuidos a las sustancias y preparados peligrosos

R1 Explosivo en estado seco.

R2 Riesgo de explosión por choque, fricción, fuego u otras fuentes de ignición.

R3 Alto riesgo de explosión por choque, fricción, fuego u otras fuentes de ignición.

R4 Forma compuestos metálicos explosivos muy sensibles.

R5 Peligro de explosión en caso de calentamiento.

R6 Peligro de explosión, en contacto o sin contacto con el aire.

R7 Puede provocar incendios.

R8 Peligro de fuego en contacto con materias combustibles.

R9 Peligro de explosión al mezclar con materias combustibles.

R10 Inflamable.

R11 Fácilmente inflamable.

R12 Extremadamente inflamable.

R14 Reacciona violentamente con el agua.

R15 Reacciona con el agua liberando gases extremadamente inflamables.

R16 Puede explosionar en mezcla con sustancias comburentes.

R17 Se inflama espontáneamente en contacto con el aire.

R18 Al usarlo pueden formarse mezclas aire-vapor explosivas/inflamables.

R19 Puede formar peróxidos explosivos.

R20 Nocivo por inhalación.

R21 Nocivo en contacto con la piel.

R22 Nocivo por ingestión.

R23 Tóxico por inhalación.

R24 Tóxico en contacto con la piel.

R25 Tóxico por ingestión.

R26 Muy tóxico por inhalación.

R27 Muy tóxico en contacto con la piel.

R28 Muy tóxico por ingestión.

R29 En contacto con agua libera gases tóxicos.

R30 Puede inflamarse fácilmente al usarlo.

R31 En contacto con ácidos libera gases tóxicos.

R32 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

R33 Peligro de efectos acumulativos.

R34 Provoca quemaduras.

R35 Provoca quemaduras graves.

R36 Irrita los ojos.

R37 Irrita las vías respiratorias.

R38 Irrita la piel.

R39 Peligro de efectos irreversibles muy graves.

R40 Posibilidad de efectos irreversibles.

R41 Riesgo de lesiones oculares graves.

R42 Posibilidad de sensibilización por inhalación.

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

R44 Riesgo de explosión al calentarlo en ambiente confinado.

R45 Puede causar cáncer.

R46 Puede causar alteraciones genéticas hereditarias.

R48 Riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada.

R49 Puede causar cáncer por inhalación.

R50 Muy tóxico para los organismos acuáticos.

R51 Tóxico para los organismos acuáticos.

R52 Nocivo para los organismos acuáticos.

R53 Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

R54 Tóxico para la flora.

R55 Tóxico para la fauna.

R56 Tóxico para los organismos del suelo.

R57 Tóxico para las abejas.

R58 Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente.

R59 Peligroso para la capa de ozono.

R60 Puede perjudicar la fertilidad.

R61 Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto.

R62 Posible riesgo de perjudicar la fertilidad.

R63 Posible riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto.

R64 Puede perjudicar a los niños alimentados con leche materna.

Combinación de las frases R

R14/15	Reacciona violentamente con el agua, liberando gases extremadamente inflamables.
R15/29	En contacto con el agua, libera gases tóxicos y extremadamente inflamables.
R20/21	Nocivo por inhalación y en contacto con la piel.
R20/22	Nocivo por inhalación y por ingestión.
R20/21/22	Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
R21/22	Nocivo en contacto con la piel y por ingestión.
R23/24	Tóxico por inhalación y en contacto con la piel.
R23/25	Tóxico por inhalación y por ingestión.
R23/24/25	Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
R24/25	Tóxico en contacto con la piel y por ingestión.
R26/27	Muy tóxico por inhalación y en contacto con la piel.
R26/28	Muy tóxico por inhalación y por ingestión.
R26/27/28	Muy tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
R27/28	Muy tóxico en contacto con la piel y por ingestión.
R36/37	Irrita los ojos y las vías respiratorias.
R36/38	Irrita los ojos y la piel.
R36/37/38	Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.
R37/38	Irrita las vías respiratorias y la piel.
R39/23	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación.
R39/24	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por contacto con la piel.
R39/25	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por ingestión.
R39/23/24	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación y contacto con la piel.
R39/23/25	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación e ingestión.
R39/24/25	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por contacto con la piel e ingestión.
R39/23/24/25	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
R39/26	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación.
R39/27	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por contacto con la piel.
R39/28	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por ingestión.
R39/26/27	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación y contacto con la piel.
R39/26/28	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación e ingestión.
R39/27/28	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por contacto con la piel e ingestión.
R39/26/27/28	Muy tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
R40/20	Nocivo: posibilidad de efectos irreversibles por inhalación.
R40/21	Nocivo: posibilidad de efectos irreversibles en contacto con la piel.
R40/22	Nocivo: posibilidad de efectos irreversibles por ingestión.
R40/20/21	Nocivo: posibilidad de efectos irreversibles por inhalación y contacto con la piel.
R40/20/22	Nocivo: Posibilidad de efectos irreversibles por inhalación e ingestión.

R40/21/22	Nocivo: posibilidad de efectos irreversibles en contacto con la piel e ingestión.
R40/20/21/22	Nocivo: posibilidad de efectos irreversibles por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
R42/43	Posibilidad de sensibilización por inhalación y en contacto con la piel.
R48/20	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación.
R48/21	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por contacto con la piel.
R48/22	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por ingestión.
R48/20/21	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación y contacto con la piel.
R48/20/22	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación e ingestión.
R48/21/22	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por contacto con la piel e ingestión.
R48/20/21/22	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
R48/23	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación.
R48/24	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por contacto con la piel.
R48/25	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por ingestión.
R48/23/24	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación y contacto con la piel.
R48/23/25	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación e ingestión.
R48/24/25	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por contacto con la piel e ingestión.
R48/23/24/25	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
R50/53	Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
R51/53	Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
R52/53	Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

ANEXO IV

Consejos de prudencia relativos a las sustancias y preparados peligrosos

S1	Consérvese bajo llave.
S2	Manténgase fuera del alcance de los niños.
S3	Consérvese en lugar fresco.
S4	Manténgase lejos de locales habitados.
S5	Consérvese en ... (líquido apropiado a especificar por el fabricante).
S6	Consérvese en ... (gas inerte a especificar por el fabricante).
S7	Manténgase el recipiente bien cerrado.
S8	Manténgase el recipiente en lugar seco.
S9	Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
S12	No cerrar el recipiente herméticamente.
S13	Manténgase lejos de alimentos, bebidas y piensos.
S14	Consérvese lejos de ... (materiales incompatibles a especificar por el fabricante).
S15	Conservar alejado del calor.
S16	Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas-No fumar.
S17	Manténgase lejos de materiales combustibles.
S18	Manipúlese y ábrase el recipiente con prudencia.
S20	No comer ni beber durante su utilización.
S21	No fumar durante su utilización.
S22	No respirar el polvo.

S23 No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles [denominación(es) adecuada(s) a especificar por el fabricante].

S24 Evítese el contacto con la piel.

S25 Evítese el contacto con los ojos.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S27 Quítese inmediatamente la ropa manchada o salpicada.

S28 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con ... (productos a especificar por el fabricante).

S29 No tirar los residuos por el desagüe.

S30 No echar jamás agua a este producto.

S33 Evítese la acumulación de cargas electrostáticas.

S35 Eliminense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36 Usese indumentaria protectora adecuada.

S37 Usense guantes adecuados.

S38 En caso de ventilación insuficiente, usese equipo respiratorio adecuado.

S39 Usese protección para los ojos/la cara.

S40 Para limpiar el suelo y los objetos contaminados por este producto, úsese ... (a especificar por el fabricante).

S41 En caso de incendio y/o de explosión no respire los humos.

S42 Durante las fumigaciones/pulverizaciones, usese equipo respiratorio adecuado. [Denominación(es) adecuada(s) a especificar por el fabricante].

S43 En caso de incendio, utilizar ... (los medios de extinción los debe especificar el fabricante). (Si el agua aumenta el riesgo, se deberá añadir: "No usar nunca agua").

S45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta).

S46 En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

S47 Consérvese a una temperatura no superior a ... ° C (a especificar por el fabricante).

S48 Consérvese húmedo con ... (medio apropiado a especificar por el fabricante).

S49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen.

S50 No mezclar con ... (a especificar por el fabricante).

S51 Usese únicamente en lugares bien ventilados.

S52 No usar sobre grandes superficies en locales habitados.

S53 Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes del uso.

S56 Eliminense esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

S57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente.

S59 Remitirse al fabricante o proveedor para obtener información sobre su recuperación/reciclado.

S60 Eliminense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

S61 Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

S62 En caso de ingestión no provocar el vómito: acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

Combinación de las frases S

S1/2	Consérvese bajo llave y manténgase fuera del alcance de los niños.
S3/7	Consérvese el recipiente bien cerrado y en lugar fresco.
S3/9/14	Consérvese en lugar fresco y bien ventilado y lejos de ... (materiales incompatibles, a especificar por el fabricante).
S3/9/14/49	Consérvese únicamente en el recipiente de origen, en lugar fresco y bien ventilado y lejos de ... (materiales incompatibles, a especificar por el fabricante).
S3/9/49	Consérvese únicamente en el recipiente de origen, en lugar fresco y bien ventilado.
S3/14	Consérvese en lugar fresco y lejos de ... (materiales incompatibles, a especificar por el fabricante).
S7/8	Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar seco.
S7/9	Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado.

S7/47	Manténgase el recipiente bien cerrado y consérvese a una temperatura no superior a ... ºC (a especificar por el fabricante).
S20/21	No comer, ni beber, ni fumar durante su utilización.
S24/25	Evítese el contacto con los ojos y la piel.
S29/56	No tirar los residuos por el desagüe.
S36/37	Usense indumentaria y guantes de protección adecuados.
S36/37/39	Usense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
S36/39	Usense indumentaria adecuada y protección para los ojos/la cara.
S37/39	Usense guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
S47/49	Consérvese únicamente en el recipiente de origen y a temperatura no superior a ... ºC (a especificar por el fabricante).

ANEXO V

METODOS DE ENSAYO

INDICE

INTRODUCCION

PARTE A: METODOS PARA LA DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

A.1. Punto de fusión/congelación.

A.2. Punto de ebullición.

A.3. Densidad relativa.

A.4. Presión de vapor.

A.5. Tensión superficial.

A.6. Hidrosolubilidad.

A.8. Coeficiente de reparto.

A.9. Punto de inflamación.

A.10. Inflamabilidad (sólidos).

A.11. Inflamabilidad (gases).

A.12. Inflamabilidad (en contacto con el agua).

A.13. Propiedades pirofóricas de sólidos y líquidos.

A.14. Propiedades explosivas.

A.15. Temperatura de autoinflamación (líquidos y gases).

A.16. Temperatura de autoinflamamción de sólidos.

A.17. Propiedades comburentes (sólidos).

PARTE B: METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA TOXICIDAD

Introducción general

B.1. Toxicidad aguda por vía oral.

B.1.bis Toxicidad aguda (oral) método de dosis fija.

B.2. Toxicidad aguda por inhalación.

B.3. Toxicidad aguda por vía cutánea.

B.4. Toxicidad aguda - irritación de la piel.

B.5. Toxicidad aguda - irritación ocular.

B.6. Sensibilización de la piel.

B.7. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía oral.

B.8. Toxicidad por administración continuada (28 días) por inhalación.

B.9. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

B.10. Mutagénesis (ensayo citogenético in vitro en mamíferos, análisis cromosómico).

B.11. Mutagénesis (ensayo citogenético in vivo en medula ósea de mamíferos, análisis cromosómico)

B.12. Mutagenicidad (ensayo de micronúcleos).

B.13. Mutagénesis (ensayo de mutación revertida en Escherichia coli).

B.14. Mutagénesis (ensayo de mutación revertida en Salmonella typhimurium).

B.15. Mutación génica, Saccharomyces cerevisiae.

B.16. Recombinación mitótica, Sccharomyces cerevisiae.

B.17. Mutación génica de células de mamíferos in vitro

B.18. Lesión y reparación de DNA -síntesis de DNA no programada- células de mamíferos in vitro

B.19. Ensayo in vitro de intercambio de cromátidas hermanas.

B.20. Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en Drosophila melanogaster.

B.21. Ensayo de transformación de células de mamífero in vitro.

B.22. Ensayo de letalidad dominante en roedores.

B.23. Ensayo citogenético de células embrionarias de mamífero in vivo.

B.24. Ensayo de la mancha en el ratón.

B.25. Translocación hereditaria en el ratón.

B.26. Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en roedores.

B.27. Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en no roedores.

B.28. Toxicidad dérmica subcrónica: ensayo de 90 días en roedores.

B.29. Toxicidad subcrónica por inhalación: ensayo de 90 días en roedores.

B.30. Estudio de teratogenicidad: roedores y no roedores.

B.31. Ensayo de toxicidad crónica.

B.32. Ensayo de carcinogénesis.

B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis.

B.34. Ensayo de reproducción en una generación.

B.35. Ensayo de reproducción en dos generaciones.

B.36. Toxicocinética.

PARTE C: METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA ECOTOXICIDAD.

C.1. Toxicidad aguda en peces.

C.2. Toxicidad aguda en Daphnia.

C.3. Ensayo de inhibición de algas.

C.4. Biodegradación: determinación de la biodegradabilidad "fácil".

C.4-A: Pérdida de carbono orgánico disuelto (COD).

C.4-B: Prueba de detección de la OCDE modificada.

C.4-C: Desprendimiento del dióxido de carbono (CO_2).

C.4-D: Respirometría manométrica.

C.4-E: Frasco cerrado.

C.4-F: MITI (Ministerio de Industria y Comercio Internacional de Japón).

Anexos.

C.5. Degradación: demanda bioquímica de oxígeno.

C.6. Degradación: demanda química de oxígeno.

C.7. Degradación: degradación abiótica en función del pH.

C.8. Biodegradación: Prueba Zahn-Wellens.

C.9. Biodegradación: Ensayo de simulación con lodo activado.

C.10. Biodegradación: Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.

C.11. Biodegradación: Prueba LASC modificada.

C.12. Toxicidad para gusanos de tierra: Ensayo con suelo artificial.

INTRODUCCION

El presente Anexo describe los métodos de ensayo para la determinación de las propiedades físicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas enumeradas en los Anexos VII y VIII de este Reglamento. Dichos métodos se basan en los métodos reconocidos y recomendados por organismos internacionales competentes (en particular la OCDE).

Cuando no se ha podido disponer de tales métodos, se han adoptado normas nacionales o métodos ampliamente reconocidos por los medios científicos. En general, los ensayos deberán hacerse con la sustancia tal y como se define en este Reglamento. No debe subestimarse la posible incidencia de las impurezas en los resultados de los ensayos.

Cuando los métodos del presente Anexo no sean adecuados al análisis de una propiedad determinada, el notificante deberá justificar el método que haya empleado en su lugar.

Los ensayos y los estudios con animales deberán atenerse a las normas nacionales y respetar los principios humanitarios, así como los progresos internacionales en el campo de la protección de animales.

Entre diversos métodos de ensayo equivalentes, se elige aquel que precisa el menor número de animales.

PARTE A: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

A.1. PUNTO DE FUSIÓN/CONGELACIÓN

1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y (3).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos y los aparatos descritos a continuación se utilizan para determinar el punto de fusión de los productos químicos, cualquiera que sea su grado de pureza.

La selección del método dependerá de la naturaleza de la sustancia problema. En consecuencia, el factor limitante dependerá de que la sustancia sea fácil, difícilmente o no pulverizable.

En determinadas sustancias será preferible determinar el punto de congelación o de solidificación; las normas para proceder a dichas determinaciones también se recogen en el presente método.

Cuando, debido a propiedades especiales de la sustancia, no pueda medirse convenientemente ninguno de los parámetros mencionados, puede ser adecuado medir el punto de fluidez.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El punto de fusión se define como la temperatura a la que se produce la transición de fase del estado sólido al líquido a presión atmosférica normal; esta temperatura corresponde idealmente a la temperatura de congelación.

Dado que la transición de fase de numerosas sustancias se extiende en una amplia gama de temperaturas, ésta se designa muchas veces con el nombre de intervalo de fusión.

Conversión de las unidades (K a °C).

$t = T - 273{,}15$

t = temperatura Celsius, grado Celsius (°C)

T = temperatura termodinámica, kelvin (K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deberán servir, esencialmente, para comprobar el funcionamiento del método de vez en cuando y para comparar con los resultados obtenidos mediante otros métodos.

En la referencia (4) se enumeran determinadas sustancias de calibración.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se determina la temperatura (o intervalo de temperatura) de transición de fase del estado sólido al líquido o viceversa. En la práctica, las temperaturas del inicio y del final del proceso de fusión/congelación se determinan al calentar/enfriar una muestra de la sustancia problema a presión atmosférica. Se describen cinco tipos de métodos: el método de tubo capilar, el método de superficie caliente, determinación de la temperatura de congelación, métodos de análisis térmico y determinación del punto de fluidez (como el método elaborado para derivados del petróleo).

En algunos casos puede ser conveniente medir la temperatura de congelación en lugar de la temperatura de fusión.

1.4.1. Método de tubo capilar

1.4.1.1. *Dispositivos de temperatura de fusión con baño líquido*

Introducir en un tubo capilar una pequeña cantidad de sustancia finamente pulverizada y comprimirla firmemente. Calentar dicho tubo al mismo tiempo que un termómetro y ajustar el aumento de temperatura a poco menos de 1 K por minuto, durante la fusión real. Tomar nota de las temperaturas correspondientes al comienzo y al final de la fusión.

1.4.1.2. *Dispositivos de temperatura de fusión con bloque metálico*

El fundamento es el mismo que el descrito en el apartado 1.4.1.1, con la diferencia de que el tubo capilar y el termómetro están colocados en un bloque de metal calentado y se observan a través de aberturas practicadas en éste último.

1.4.1.3. *Detección fotoeléctrica*

Calentar automáticamente en un cilindro metálico la muestra contenida en el tubo capilar. Por una abertura practicada en el cilindro, enviar un rayo de luz a través de la sustancia hacia una célula fotoeléctrica cuidadosamente calibrada. En el momento de la fusión, las propiedades ópticas de la mayor parte de las sustancias se modifican en el sentido de que la opacidad da paso a la transparencia. En consecuencia, la intensidad de la luz que llega a la célula fotoeléctrica aumenta y envía una señal de parada al indicador digital que registra la temperatura del termómetro de resistencia de platino colocado en la cámara de calentamiento. Este método no es aplicable a determinadas sustancias muy coloreadas.

1.4.2. Método de superficie caliente

1.4.2.1. *Método de la placa caliente de Kofler*

La placa caliente de Kofler se compone de dos piezas de metal de conductividad térmica diferente, que se calientan eléctricamente. Está hecha de manera que el gradiente de temperatura sea casi lineal en toda su longitud. La temperatura de dicha placa puede variar de 283 a 573 K gracias a un dispositivo especial de lectura de la temperatura que tiene un cursor con un índice y una regleta graduada, especialmente concebido para dicha placa. Para determinar un punto de fusión se deposita una fina capa de sustancia directamente sobre la placa caliente. En unos segundos, se forma una fina línea de división entre la fase fluida y la fase sólida. Leer la temperatura a la altura de dicha línea, colocando el índice frente a esta última.

1.4.2.2. *Microscopio de fusión*

Se utilizan diferentes microscopios de platina caliente para determinar puntos de fusión con cantidades de sustancia muy pequeñas. La temperatura se suele medir con un termopar sensible, pero a veces se usa un termómetro de mercurio. El dispositivo tipo tiene una carcasa de calor que contiene una platina de metal en la que se coloca una lámina de vidrio sobre la que se deposita la muestra. El centro de la platina metálica se atraviesa con un agujero que permite el paso de la luz procedente del espejo de iluminación del microscopio. Al utilizarlo, la carcasa se cierra con una placa de vidrio para impedir la entrada de aire a la zona de la muestra.

El calentamiento de la muestra se regula con un reostato. Para realizar mediciones muy precisas se puede utilizar luz polarizada en el análisis de las sustancias ópticamente anisótropas.

1.4.2.3. *Método de menisco*

Este método se aplica específicamente a las poliamidas.

Se determina la temperatura a la cual se observa, a simple vista, el desplazamiento de un menisco de aceite de silicona, atrapado entre una superficie caliente y un cubreobjetos colocado encima de la muestra de poliamida.

1.4.3. Método de determinación del punto de congelación

Introducir la muestra en un tubo de ensayo especial y colocarlo en un aparato que permita la determinación del punto de congelación. Agitar suavemente la muestra sin interrupción durante el enfriamiento, observando al

mismo tiempo la temperatura y registrándola a intervalos adecuados. Cuando varias lecturas indiquen una temperatura constante (previa corrección termométrica), se considera el valor de esta temperatura como el punto de congelación.

Debe evitarse el sobreenfriamiento manteniendo el equilibrio entre las fases sólida y líquida.

1.4.4. **Análisis térmico**

1.4.4.1. *Análisis térmico diferencial (ATD)*

Esta técnica registra la diferencia de temperaturas entre la sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Cuando la muestra sufre una transición que suponga un cambio de entalpía, ese cambio se indicará por una desviación endotérmica (fusión) o exotérmica (congelación) de la línea de base del registro de temperatura.

1.4.4.2. *Calorimetría diferencial de barrido (CDB)*

Esta técnica registra la diferencia de aporte energético a una sustancia y a un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Esta energía es la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la sustancia y el material de referencia. Cuando la muestra sufre una transición que suponga un cambio de entalpía, ese cambio se indicará por una desviación endotérmica (fusión) o exotérmica (congelación) de la línea de base del registro del flujo de calor.

1.4.5. **Punto de fluidez**

Este método, desarrollado para los derivados del petróleo, es adecuado para utilizarse con sustancias oleosas de baja temperatura de fusión.

Tras un calentamiento previo, se va enfriando la muestra a una velocidad específica y se examinan sus características reológicas a intervalos de 3 K. Se registra como punto de fluidez la temperatura mínima a la que se aprecia movimiento de la sustancia.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

En el cuadro siguiente se indican las condiciones de aplicación y la precisión de los diferentes métodos de determinación del punto de fusión/intervalo de fusión.

CUADRO: APLICABILIDAD DE LOS MÉTODOS

A. Método de tubo capilar

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilm. pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existente
Dispositivo de temp. de fusión con baño líquido	Sí	Sólo algunas	De 273 a 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Dispositivo de temp. de fusión con un bloque metálico	Sí	Sólo algunas	De 293 a >573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Detección fotoeléctrica	Sí	Varias con dispositivos de aplicación	De 253 a 573 K	± 0,5 K	

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

B. Métodos de superficie caliente y de congelación

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilm. pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existente
Placa caliente Kofler	Sí	No	De 283 a >573 K	± 1,0 K	ANSI/ ASTM D 345176
Microscopio de fusión	Sí	Sólo algunas	De 273 a >573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Método de menisco	No	Específico de las poliamidas	De 293 a >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Métodos de punto de congelación	Sí	Sí	De 223 a 573 K	± 0,5 K	por ejemplo BS 4695

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

C. Análisis térmico

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilm. pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existente
Análisis térmico diferencial	Sí	Sí	De 173 a 1 273 K	hasta 600 K ± 0,5 K hasta 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776
Calorimetría diferencial de barrido	Sí	Sí	De 173 a 1 273 K	hasta 600 K ± 0,5 K hasta 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

D. Punto de fluidez

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilm. pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existente
Punto de fluidez	Para derivados del petróleo y sustancias oleosas	Para derivados del petróleo y sustancias oleosas	De 223 a 323 K	± 3,0 K	ASTM D 9766

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

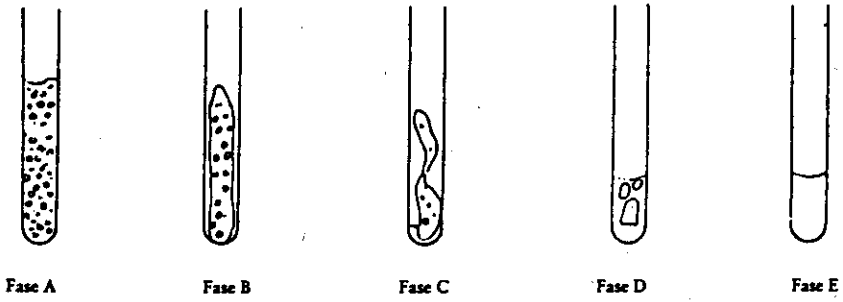
1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Los procedimientos de casi todos los métodos de ensayo están descritos en normas internacionales y nacionales (ver apéndice 1).

1.6.1. **Métodos de tubo capilar**

Cuando la elevación de temperatura es lenta, las sustancias finamente pulverizadas pasarán, normalmente, por las fases de fusión representadas en la figura 1:

Figura 1



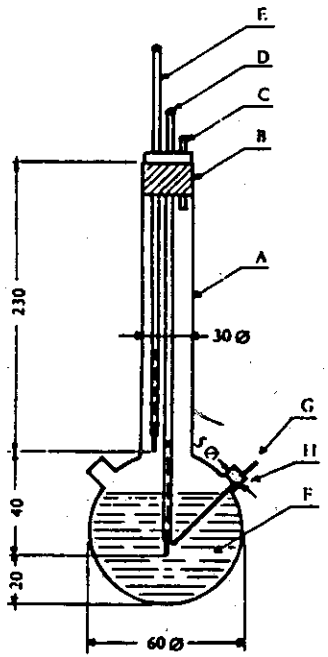
Fase A	(Comienzo de la fusión): se adhieren uniformemente gotas finas a la pared interior del tubo capilar.
Fase B	Aparece un espacio libre entre la muestra y la pared interior, en razón de la retracción del producto en fusión.
Fase C	La muestra, retraída, comienza a hundirse y a licuarse.
Fase D	Se forma un menisco completo en la superficie, pero queda todavía una cantidad apreciable de partículas sólidas.
Fase E	(Final de la fusión): no hay ya ninguna partícula sólida.

Durante la determinación del punto de fusión, conviene anotar la temperatura al comienzo y al final de la fusión.

1.6.1.1. *Dispositivos con baño líquido*

La figura 2 representa un tipo de aparato estandarizado de vidrio (JIS K 0064). Todas las dimensiones están expresadas en milímetros.

Figura 2



A: Matraz de medida

B: Tapón

C: Tubo de ventilación

D: Termómetro

E: Termómetro auxiliar

F: Baño líquido

G: Tubo capilar de vidrio (80 a 100 mm de longitud; 1,0 mm ± 0,2 mm de diámetro interior y 0,2 a 0,3 mm de espesor de la pared)

H: Tubo lateral

Baño líquido

El líquido deberá elegirse en función del punto de fusión que deba determinarse; por ejemplo, se utilizará parafina líquida para los puntos de fusión que no pasen de 473 K, aceite de silicona para los puntos de fusión que no pasen de 573 K.

Podrá utilizarse una mezcla de tres partes de ácido sulfúrico y dos partes de sulfato de potasio (en peso) para los puntos de fusión superiores a 523 K. Deben adoptarse precauciones adecuadas cuando se utilice este tipo de mezcla.

Termómetro

Sólo podrán utilizarse termómetros que cumplan las exigencias de las normas siguientes o de sus equivalentes:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Procedimiento

Pulverizar finamente la sustancia seca en un mortero e introducirla en un tubo capilar cerrado en un extremo. La altura del contenido será de unos 3 milímetros después de haberlo comprimido bien. Para obtener una muestra uniformemente comprimida, hay que dejar caer el tubo capilar desde una altura de unos 700 milímetros por el interior de un tubo de vidrio colocado verticalmente sobre un vidrio de reloj.

Colocar el tubo capilar, así llenado, en el baño de tal manera que la parte central del bulbo de mercurio del termómetro esté en contacto con la parte del capilar que contiene la muestra. En general, el tubo capilar se introduce en el aparato en el momento en que el baño está a unos 10 K por debajo del punto de fusión.

Regular el calentamiento del baño de manera que el aumento de la temperatura sea de unos 3 K/minuto. Agitar el líquido. Al llegar a unos 10 K por debajo de la temperatura de fusión esperada, regular el aumento de temperatura a un máximo de 1 K/minuto.

Cálculo

El cálculo del punto de fusión se efectúa mediante la fórmula siguiente:

$$T = T_D + 0{,}00016(T_D - T_E)\,n$$

donde

T = temperatura de fusión corregida, expresada en K

T_D = temperatura leída en el termómetro D, expresada en K

T_E = temperatura leída en el termómetro E, expresada en K

n = número de graduaciones de la columna de mercurio del termómetro D en el vástago emergente.

1.6.1.2. *Dispositivo con bloque metálico*

Aparato:

El aparato consta de:

— un bloque metálico cilíndrico cuya parte superior está vacía y forma un recinto de calentamiento (ver figura 3).

— un tapón metálico atravesado por dos o más agujeros que permitan la introducción de los tubos en el bloque,

— un sistema de calentamiento del bloque metálico; por ejemplo, una resistencia eléctrica incorporada al bloque,

— un reostato para regular la potencia, si se utiliza calentamiento eléctrico,

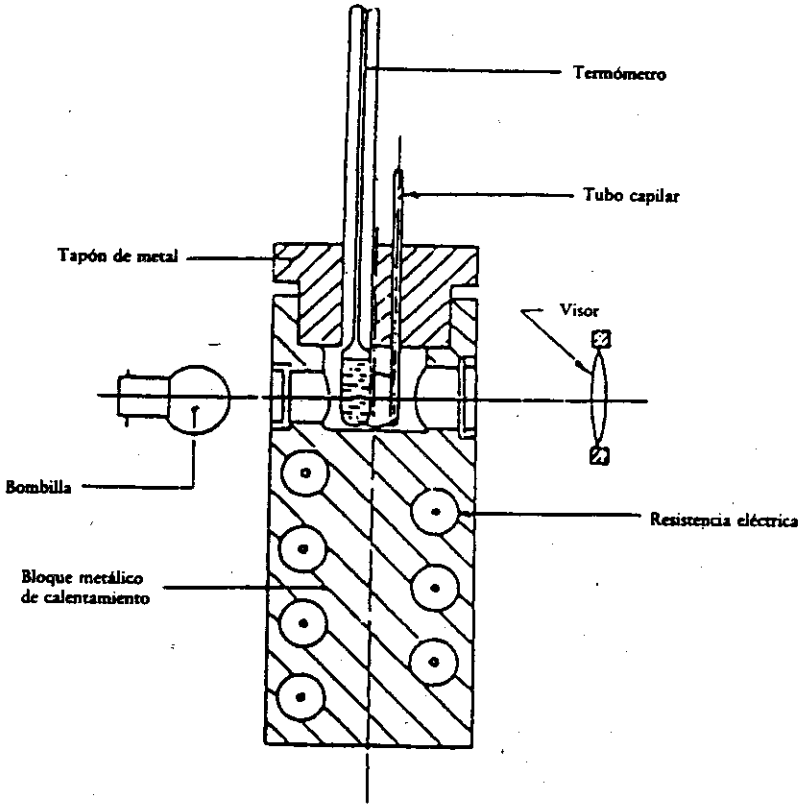
— cuatro ventanas de vidrio resistente al calor, diametralmente opuestas, en ángulo recto, en las paredes laterales del recinto. Frente a una de dichas ventanas se instalará un visor para observar el tubo capilar. Las otras tres ventanas permitirán iluminar el interior del recinto mediante bombillas,

— un tubo capilar, de vidrio resistente al calor, cerrado en un extremo (ver punto 1.6.1.1).

Termómetro:

Ver las normas citadas en el punto 1.6.1.1. También podrán utilizarse elementos termoeléctricos de una precisión equivalente.

Figura 3



1.6.1.3. *Detección fotoeléctrica*

Aparato y procedimiento:

El aparato consiste en un recinto metálico dotado de un sistema de calentamiento automático. Se llenan tres tubos capilares siguiendo las instrucciones del punto 1.6.1.1 y se colocan en el horno.

Se pueden hacer varios aumentos lineales de temperatura para calibrar el aparato. El aumento de temperatura apropiado se regula eléctricamente con una velocidad constante y lineal preseleccionada. Los aparatos registradores indican la temperatura real del horno y la temperatura de la sustancia en los tubos capilares.

1.6.2. **Métodos de superficie caliente**

1.6.2.1. *Placa caliente Kofler*

Ver apéndice.

1.6.2.2. *Microscopio de fusión*

Ver apéndice.

1.6.2.3. *Método de menisco (poliamidas)*

Ver apéndice.

El aumento de temperatura en la zona del punto de fusión deberá ser inferior a 1 K/min .

1.6.3. **Métodos de determinación del punto de congelación**

Ver apéndice.

1.6.4. **Análisis térmico**

1.6.4.1. *Análisis térmico diferencial*

Ver apéndice.

1.6.4.2. *Calorimetría diferencial de barrido*

Ver apéndice.

1.6.5. **Determinación del punto de fluidez**

Ver apéndice.

2. **RESULTADOS**

En determinados casos es necesaria la corrección del termómetro.

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— estimación de la precisión.

El punto de fusión indicado en el informe será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas en la zona de la precisión estimada (ver cuadro).

Si la diferencia entre las temperaturas al comienzo y al final de la fusión se encuentra dentro de los límites de precisión del método, la temperatura leída en la fase final de la fusión se considerará el punto de fusión; de lo contrario, se indicarán las dos temperaturas.

Si la sustancia se descompone o se sublima antes de alcanzar el punto de fusión, se indicará la temperatura a la que se observa el efecto.

Deben indicarse todas las informaciones y observaciones que se consideren útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics., Butterworths, Londres, 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd. ed., Interscience Publ., Nueva York, 1959, Vol I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

Apéndice

Para más detalles técnicos, se pueden consultar, por ejemplo, las normas siguientes:

1. Métodos de tubo capilar

1.1. Dispositivos con baño líquido

ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals
BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products

1.2. Dispositivos con bloque metálico

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

2. Métodos de superficie caliente

2.1. Placa caliente de Kofler

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings

2.2. Microscopio de fusión

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Método de menisco (poliamidas)

ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of «Melting- Point»
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard Specification for Acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials
NF T 51 050	Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque

3. Métodos de determinación del punto de congelación

BS 4633	Method for the Determination of Crystallizing Point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristalisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. Análisis térmico

4.1. Análisis térmico diferencial

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Calorimetría diferencial de barrido

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. Determinación del punto de fusión

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils —Determination of pour point.

A.2. PUNTO DE EBULLICIÓN

1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y (3).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos y dispositivos aquí descritos pueden aplicarse a las sustancias líquidas y de bajo punto de fusión que no sufran reacción química por debajo del punto de ebullición (por ejemplo, autooxidación, redistribución, degradación, etc.). Los métodos son aplicables a las sustancias líquidas puras e impuras.

La importancia dada a la descripción de los métodos basados en la detección fotoeléctrica y en el análisis térmico se debe al hecho de que estos métodos permiten determinar no sólo el punto de fusión sino también el punto de ebullición. Además, las medidas pueden efectuarse de manera automática.

El «método dinámico» tiene la ventaja de poder utilizarse igualmente para la determinación de la presión de vapor y hacer innecesaria la corrección de la temperatura de ebullición para llevarla a las condiciones normales de presión (101,325 kPa), ya que durante la medición se puede ajustar la presión normal mediante un manostato.

Observaciones

La influencia de las impurezas en la determinación del punto de ebullición depende mucho de la naturaleza de la impureza. Si en la muestra hay impurezas volátiles, que pudieran afectar a los resultados, puede procederse a purificar la sustancia.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La temperatura de ebullición normal se define como la temperatura en que la presión de vapor de un líquido es 101,325 kPa.

Si la temperatura de ebullición no se mide a la presión atmosférica normal, la dependencia de la presión de vapor respecto a la temperatura puede calcularse cuantitativamente por la ecuación de Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + \text{constante}$$

donde

p = presión de vapor de la sustancia en pascales

ΔH_v = su calor de vaporización en J mol^{-1}

R = constante universal de los gases = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura termodinámica, expresada en K.

La temperatura de ebullición se establece con relación a la presión ambiente en el momento de la medición.

Conversiones

Presión (unidad: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa
(todavía se permite la unidad «bar» pero no es recomendable).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr
(no se permite la unidad «Torr» ni «mm Hg»).

1 atm = atmósfera normal = 101 325 Pa
(no se permite la unidad «atm»).

Temperatura (unidad: K)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura Celsius, grado Celsius (°C)

T: temperatura termodinámica, Kelvin (K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven esencialmente para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados según otros métodos.

En los métodos enumerados en el Apéndice figuran algunas sustancias de calibración.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Cinco métodos de determinación del punto de ebullición (o del intervalo de ebullición) se basan en la medición de la temperatura de ebullición; otros dos se basan en el análisis térmico.

1.4.1. Método del ebullómetro

Aunque en un principio los ebullómetros se pensaron para determinar el peso molecular por elevación del punto de ebullición, se prestan también para realizar mediciones exactas del punto de ebullición. En la norma ASTM D 1120-72 (véase el Apéndice), se describe un aparato muy sencillo. En dicho aparato, el líquido se calienta en condiciones de equilibrio a la presión atmósferica hasta ebullición.

1.4.2. Método dinámico

Este método se basa en la medición de la temperatura de recondensación del vapor mediante un termómetro adecuado que se coloca en el reflujo durante la ebullición. En este método puede modificarse la presión.

1.4.3. Método de destilación para el punto de ebullición

Este método se basa en la destilación del líquido, la medida de la temperatura de recondensación del vapor y la determinación de la cantidad de destilado.

1.4.4. Método de Siwoloboff

Se calienta una muestra en un tubo de ensayo, que se sumerge en un baño caliente. Se introduce en el tubo de ensayo un capilar cerrado, con una burbuja de aire en su parte inferior.

1.4.5. Detección fotoeléctrica

De acuerdo con el principio de Siwoloboff, la ascensión de las burbujas permite una medición fotoeléctrica automática.

1.4.6. Análisis térmico diferencial

Esta técnica registra la diferencia de temperatura entre la sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Cuando la muestra sufre una transición que implique un cambio de entalpía, ese cambio se indica con una desviación endotérmica (ebullición) respecto a la línea base del registro de temperatura.

1.4.7. **Calorimetría diferencial de barrido**

Esta técnica registra la diferencia de aporte energético a una sustancia y a un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Esta energía es la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la sustancia y el material de referencia. Cuando la muestra sufre una transición que implique un cambio de entalpía, ese cambio se indica con una desviación endotérmica (ebullición) respecto a la línea base del registro de flujo de calor.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La aplicación y la precisión de los diferentes métodos utilizados para determinar el punto de ebullición/intervalo de ebullición se indican en el cuadro 1.

CUADRO 1: COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS

Método de medición	Precisión estimada	Norma existente
Ebullómetro	± 1,4 K (hasta 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (hasta 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Método dinámico	± 0,5 K (hasta 600 K) (2)	
Método de destilación (intervalo de ebullición)	± 0,5 k (hasta 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Método de Siwoloboff	± 2 K (hasta 600 K) (2)	
Detección fotoeléctrica	± 0,3 K (a 373 K) (2)	
Calorimetría térmica diferencial	± 0,5 K (hasta 600 K) ± 2,0 K (hasta 1 273 K)	ASTM E 537-76
Calorimetría diferencial de barrido	± 0,5 K (hasta 600 K) ± 2,0 K (hasta 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Esta precisión sólo es válida para aparatos sencillos, como el descrito en la norma ASTM D 1120-72; es posible mejorarla utilizando ebullómetros más perfeccionados.
(2) Válido solamente para sustancias puras. El uso en otras circunstancias debe justificarse.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

En las normas internacionales y nacionales (veáse el Apéndice) se describen los procedimientos de algunos métodos de ensayo.

1.6.1. **Ebullómetro**

Veáse el Apéndice.

1.6.2. **Método dinámico**

Veáse el método de ensayo A.4 para la determinación de la presión de vapor.

Se considera como temperatura de ebullición la registrada a una presión de 101,325 kPa.

1.6.3. **Método de destilación (intervalo de ebullición)**

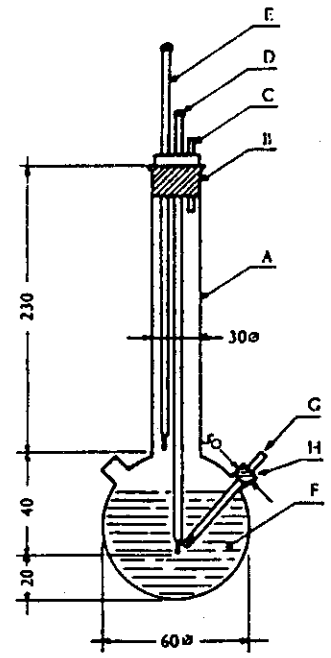
Veáse el Apéndice.

1.6.4. **Método de Siwoloboff**

Se introduce la muestra en un tubo de muestra de unos 5 milímetros de diámetro y se calienta en un aparato apropiado para determinar el punto de fusión (veáse la figura 1).

En la figura 1 hay un ejemplo de aparato normalizado apropiado para determinar el punto de fusión y el punto de ebullición (JIS K 0064). Las dimensiones están expresadas en milímetros. El aparato es de vidrio.

Figura 1



A: Matraz de medida
B: Tapón
C: Tubo de ventilación
D: Termómetro
E: Termómetro auxiliar
F: Baño líquido
G: Tubo de muestra (5 mm de diámetro exterior como máximo) con un tubo capilar de unos 100 mm de longitud, alrededor de 1 mm de diámetro interior, y alrededor de 0,2 o 0,3 mm de espesor de la pared
H: Tubo lateral

En el tubo de muestra que contiene la sustancia se introduce un tubo capilar (capilar de ebullición), cerrado a aproximadamente 1 centímetro de su extremo inferior. El nivel hasta el que se añade la sustancia problema es tal que la parte cerrada del capilar quede situada por debajo de la superficie del líquido. El tubo de muestra con el capilar de ebullición debe estar unido al termómetro mediante una cinta elástica o un soporte lateral (veáse la figura 2).

Figura 2

Método de Siwoloboff

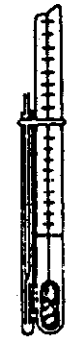
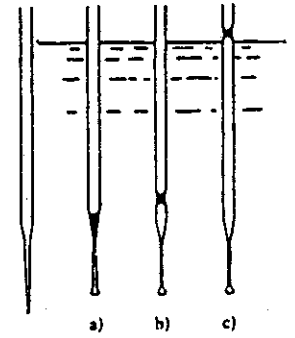


Figura 3

Método modificado



El líquido del baño se elige en función de la temperatura de ebullición. Se puede utilizar aceite de silicona para temperaturas de hasta 573 K. La parafina líquida sólo puede usarse para temperaturas inferiores a 473 K. Al principio, el calentamiento del baño debe graduarse de manera que se obtenga un aumento de temperatura de 3 K por minuto. Hay que agitar el líquido del baño. A unos 10 K por debajo del punto de ebullición supuesto, se reduce el calentamiento de tal manera que el aumento de la temperatura no llegue a 1 K/minuto. Al acercarse a la temperatura de ebullición, comienzan a salir rápidamente burbujas del capilar de ebullición.

El punto de ebullición se define como la temperatura a la cual, en un enfriamiento momentáneo, se interrumpe el rosario de burbujas y el líquido comienza a elevarse súbitamente por el capilar. La temperatura leída en el termómetro en ese preciso momento corresponde a la temperatura de ebullición de la sustancia de ensayo.

En el método modificado (véase la figura 3), el punto de ebullición se determina en un capilar de punto de fusión. Este último se alarga en una punta fina de unos 2 centímetros de longitud (a) y se aspira hacia el interior una pequeña cantidad de sustancia. El extremo abierto del fino capilar se cierra por fusión, de forma que quede una pequeña burbuja de aire en el extremo. Al calentarla en el aparato de punto de fusión (b), la burbuja de aire se va dilatando. El punto de ebullición corresponde a la temperatura a la que el tapón de muestra llega al nivel de la superficie del baño de líquido (c).

1.6.5. **Detección fotoeléctrica**

Se calienta una muestra de la sustancia en un tubo capilar colocado dentro de un bloque metálico de calentamiento.

Por las aberturas practicadas en el bloque, se envía un haz de luz a través de la sustancia hacia una célula fotoeléctrica calibrada en forma precisa.

Durante el aumento de la temperatura de la muestra, van escapando del capilar de ebullición algunas burbujas aisladas de aire. Cuando se alcanza la temperatura de ebullición, el número de burbujas aumenta mucho. La consiguiente modificación de la intensidad luminosa es registrada por la célula, que envía una señal de interrupción al indicador que da la temperatura de un termómetro de resistencia de platino colocado en el bloque.

Este método es especialmente útil, pues permite efectuar determinaciones por debajo de la temperatura ambiente hasta 253,15 K (– 20 °C) sin ninguna modificación del aparato. Basta con colocar éste en un baño refrigerante.

1.6.6. **Análisis térmico**

1.6.6.1. *Análisis térmico diferencial*

Veáse el Apéndice.

1.6.6.2. *Calorimetría diferencial de barrido*

Ver Apéndice.

2. **RESULTADOS**

Cuando haya diferencias pequeñas respecto a la presión normal (máxima de ± 5 kPa), las temperaturas del punto de ebullición podrán normalizarse a T_n mediante la ecuación de valor numérico de Sidney Young:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

donde

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [atención al signo]

p = medida de la presión, en kPa

f_T = tasa de variación del punto de ebullición con la presión, en K/kPa

T = valor medido de la temperatura de ebullición, en K

T_n = valor de la temperatura de ebullición corregido a presión normal, en K.

Los factores de corrección de la temperatura (f_T) y las ecuaciones para su aproximación figuran en las normas internacionales citadas en el texto para numerosas sustancias.

Por ejemplo, el método DIN 53171 presenta las siguientes correcciones aproximadas para disolventes contenidos en las pinturas:

CUADRO 2: FACTORES DE CORRECCIÓN DE LA TEMPERATURA (f_T)

Temperatura T en K	Factor de corrección f_T en K/kPa
322,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado;

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa;

— estimación de la precisión.

El punto de ebullición registrado será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas en la zona de precisión estimada (véase el cuadro 1).

Deberán indicarse los valores medidos de los puntos de ebullición así como su media, y la presión o presiones a que se hayan efectuado las mediciones deberán registrarse en kPa. La presión debe, preferentemente, ser próxima a la presión atmosférica normal.

Deben suministrarse todas las informaciones y observaciones que se consideren útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C (81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, Londres 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., Nueva York, 1959, vol. 1, Part 1, Chapter VIII.

Apéndice

Para más detalles técnicos, se pueden consultar las normas siguientes:

1. **Ebullómetro**

ASTM D 1120-72 Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. Método de destilación (intervalo de ebullición)

ISO/R 918	Test method for distillation (distillation yield and distillation range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe. Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. Análisis térmico diferencial y calorimetría diferencial de barrido

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

A.3. DENSIDAD RELATIVA

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en la referencia (2).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos descritos de determinación de la densidad relativa son aplicables a las sustancias sólidas y líquidas, cualquiera que sea su grado de pureza. En el cuadro 1 se indican los diversos métodos utilizables.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La densidad relativa, D_4^{20}, de los sólidos o líquidos es la relación entre la masa de un volumen de sustancia problema, determinada a 20 °C, y la masa del mismo volumen de agua, determinada a 4 °C. La densidad relativa es un número adimensional.

La densidad, ρ, de una sustancia es el cociente de su masa m por su volumen v.

En unidades SI, la densidad, ρ, se expresa en kilogramos por metro cúbico.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA (1) (3)

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deben utilizarse, esencialmente, para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS

Se aplican cuatro clases de métodos.

1.4.1. Métodos de flotabilidad

1.4.1.1. *Areómetro* (para líquidos)

Se pueden obtener determinaciones de densidad suficientemente precisas y rápidas con areómetros flotantes, que permiten deducir la densidad de un líquido a partir de la profundidad de inmersión leída en una escala graduada.

1.4.1.2. *Balanza hidrostática* (para sustancias líquidas y sólidas)

La diferencia entre el peso de una muestra medido en el aire y en un líquido adecuado (como el agua) puede servir para determinar su densidad.

En el caso de los sólidos, la densidad medida sólo es representativa de la muestra utilizada en concreto. Para determinar la densidad de un líquido, se pesa un cuerpo, con un volumen v conocido, primero en el aire y luego en el líquido.

1.4.1.3. *Método del cuerpo sumergido* (para las sustancias líquidas) (4)

En este método, la densidad de un líquido se determina a partir de la diferencia entre los resultados de la pesada del líquido, antes y después de sumergir un cuerpo de volumen conocido en dicho líquido problema.

1.4.2. Métodos picnométricos

Para sólidos o líquidos, se pueden utilizar picnómetros de diversas formas cuyos volúmenes sean conocidos. La densidad se calculará a partir de la diferencia de peso entre el picnómetro lleno y el picnómetro vacío, por una parte, y de su volumen conocido, por la otra.

1.4.3. Picnómetro de comparación de aire (para sólidos)

La densidad de un sólido, cualquiera que sea su forma, se puede medir a la temperatura ambiente mediante un picnómetro de comparación de gases. El volumen de una sustancia en el aire o en un gas inerte se mide en una probeta calibrada de volumen variable. Para el cálculo de la densidad, se efectúa una medida de la masa después de la medida del volumen.

1.4.4. Densímetro oscilante (5) (6) (7)

La densidad de un líquido se puede medir con un densímetro oscilante. Un oscilador mecánico con forma de tubo en U se hace vibrar a la frecuencia de resonancia del oscilador, que depende de su masa. La introducción de una muestra modifica la frecuencia de resonancia del oscilador, el cual debe calibrarse con ayuda de dos sustancias líquidas de densidades conocidas. Las sustancias deben elegirse de tal manera que sus densidades cubran el intervalo de medición.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

En el cuadro se indica la aplicabilidad de los diferentes métodos que se utilizan para determinar la densidad relativa.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Las referencias de las normas citadas como ejemplo, las cuales pueden consultarse para obtener detalles técnicos suplementarios, figuran en el apéndice.

Los ensayos deberán realizarse a la temperatura de 20 °C y deben hacerse, al menos, dos medidas.

2. RESULTADOS

Ver normas.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado;

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa.

También se indicarán tanto la densidad relativa, D_4^{20}, según lo definido en el punto 1.2, como el estado físico de la sustancia examinada.

Deben suministrarse todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

CUADRO: APLICABILIDAD DE LOS MÉTODOS

Método de medida	Densidad		Viscosidad dinámica máxima posible	Normas existentes
	sólido	líquido		
1.4.1.1. Areómetro		Sí	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Balanza hidrostática				
a) sólidos	Sí			ISO 1183 (A)
b) líquidos		Sí	5 Pa S	ISO 901 y 758
1.4.1.3. Método del cuerpo sumergido		Sí	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Picnómetro				
a) sólidos	Sí			ISO 3507 ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) líquidos		Sí	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Picnómetro de comparación de aire	Sí			DIN 55990 parte 3, DIN 53243
1.4.4. Densímetro oscilante		Sí	5 Pa s	

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ. Nueva York, 1959, Vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties. — Pure and Applied Chemistry, 1976, Vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, Vol 11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, Vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, Vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, Vol. 9, 253-255.

Apéndice

Para más detalles técnicos, se pueden consultar las normas siguientes:

1. MÉTODOS DE FLOTABILIDAD

1.1. Areómetro

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer: general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
	Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation
	Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Balanza hidrostática

Para sustancias sólidas

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Para sustancias líquidas

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density.
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 y ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Métodos del cuerpo sumergido

DIN 53 217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. MÉTODOS PICNOMÉTRICOS

2.1. Para sustancias líquidas

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100,10^{-6}$ $m^2 s^{-1}$ at 15 °C)

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100{,}10^{-6}$ $m^2 s^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products — chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use— Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method

2.2. Para sustancias sólidas

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. PICNÓMETRO DE COMPARACIÓN DE AIRE

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

A.4. PRESIÓN DE VAPOR

1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y (3).

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos previos sobre la estructura, el punto de fusión y el punto de ebullición de la sustancia antes de proceder al ensayo.

No hay ningún método de medida que sea aplicable a toda la gama de presiones de vapor. Por eso se recomiendan varios métodos para medir las presiones de vapor que van de $< 10^{-4}$ Pa a 10^5 Pa.

En general, las impurezas influyen sobre la presión de vapor en una medida que depende en gran parte de la naturaleza de la impureza.

Cuando la sustancia contenga impurezas volátiles que puedan afectar el resultado, será posible purificar la sustancia. También puede ser adecuado indicar la presión de vapor del material técnico.

Algunos de los métodos descritos aquí utilizan equipos con partes metálicas; esto deberá tenerse en cuenta cuando se estudien sustancias corrosivas.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La presión de vapor de una sustancia es la presión de saturación por encima de la sustancia sólida o líquida. En equilibrio termodinámico, la presión de vapor de una sustancia pura es función únicamente de la temperatura.

La unidad SI de presión que se debe utilizar es el pascal (Pa).

Los factores de conversión de las unidades que solían utilizarse en el pasado, son:

1 Torr (= 1 mm Hg)	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmósfera	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa
1 bar	=	10^5 Pa

La unidad SI de temperatura es el grado Kelvin (K).

La constante universal molar de los gases R es 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

La relación de la presión de vapor con la temperatura se refleja en la ecuación de Clausius-Clapeyron;

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + \text{const.}$$

donde

p = presión de vapor de la sustancia en pascales

ΔH_v = calor de vaporización en J mol^{-1}

R = constante universal molar de los gases en J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura termodinámica en K.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Dichas sustancias deberán servir, esencialmente, para comprobar de vez en cuando la validez del método y para comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS

Se proponen siete métodos para determinar la presión de vapor, aplicables a diferentes gamas de presiones de vapor. En cada uno de los métodos, la presión de vapor se determina a diferentes temperaturas. En una gama de temperaturas limitada, el logaritmo de la presión de vapor de una sustancia pura es una función lineal de la inversa de la temperatura.

1.4.1. Método dinámico

El método dinámico se basa en la medida de la temperatura de ebullición correspondiente a una presión específica.

Intervalo recomendado:

de 10^3 hasta 10^5 Pa.

Este método se ha recomendado también para determinar el punto de ebullición normal y, para este fin, es útil hasta a 600 K.

1.4.2. Método estático

En este procedimiento, la presión de vapor que se establece en un sistema cerrado, en equilibrio termodinámico, se determina a una temperatura específica. Este método es aplicable a sólidos y líquidos que contengan uno o varios componentes.

Intervalo recomendado:

de 10 hasta 10^5 Pa. Este método puede utilizarse también en el intervalo de 1 a 10 Pa siempre que se tenga cuidado.

1.4.3. Isoteniscopio

Este método normalizado es también un procedimiento estático, pero no es aplicable generalmente a los sistemas con varios componentes. Se puede encontrar información suplementaria en la norma ASTM D-2879-86.

Intervalo recomendado:

de 100 hasta 10^5 Pa.

1.4.4. Método de efusión: Balanza de presión de vapor

La cantidad de sustancia que sale por unidad de tiempo de un compartimento a través de una abertura de tamaño conocido, se determina bajo presión reducida para que el retorno de sustancia al compartimento-depósito sea despreciable (por ejemplo, midiendo el impulso que imprime a una balanza sensible un chorro de vapor o, también, midiendo la pérdida de peso del compartimento-depósito).

Intervalo recomendado:

de 10^{-3} hasta 1 Pa.

1.4.5. Método de efusión: Pérdida de peso o retención de la parte evaporada

El método se basa en la estimación de la masa de sustancia problema que sale por unidad de tiempo de una célula Knudsen (4) en forma de vapor a través de un microorificio en condiciones de ultravacío. La masa de vapor desprendido puede obtenerse o bien determinando la pérdida de masa de la célula o bien condensando el vapor a baja temperatura y determinando la cantidad de sustancia volatilizada mediante análisis cromatográfico. La presión de vapor se calcula según la relación de Hertz-Knudsen.

Intervalo recomendado:

de 10^{-3} hasta 1 Pa.

1.4.6. Método de saturación de gases

Se envía una corriente de gas portador inerte sobre la sustancia para que aquél se sature del vapor de ésta. La medida de la cantidad de sustancia transportada por un volumen conocido de gas portador puede realizarse o bien mediante su recogida en un sifón adecuado o bien mediante una técnica analítica acoplada. Así se puede calcular después la presión de vapor a una temperatura dada.

Intervalo recomendado:

de 10^{-4} hasta 1 Pa. Este método puede utilizarse también en el intervalo de 1 a 10 Pa siempre que se tenga cuidado.

1.4.7. Rotor

En el indicador de rotor, el elemento medidor en realidad es una pequeña bola de acero, suspendida en un campo magnético, que gira a gran velocidad. La presión del gas se deduce del frenado de la bola de acero, que depende de la presión.

Intervalo recomendado:

de 10^{-4} hasta 0,5 Pa.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

El cuadro siguiente muestra una tabla comparativa de la aplicación, repetibilidad, reproducibilidad, intervalos de medida y normas existentes de los diferentes métodos de determinación de la presión de vapor.

CUADRO: CRITERIO DE CALIDAD

Método de medida	Sustancia		Repetibilidad estimada (1)	Reproducibilidad estimada (1)	Intervalo recomendado	Norma existente
	sólida	líquida				
1.4.1. Método dinámico	Fusión baja	Sí	Hasta el 25%	Hasta el 25%	De 10^3 Pa a 2×10^3 Pa	—
			1-5%	1-5%	De 2×10^3 Pa a 10^5 Pa	—
1.4.2. Método estático	Sí	Sí	5-10%	5-10%	De 10 Pa a 10^5 Pa (2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Isoteniscopio	Sí	Sí	5-10%	5-10%	De 10^2 Pa a 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Método de efusión: Balanza de presión de vapor	Sí	Sí	5-20%	Hasta el 50%	De 10^{-3} Pa a 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Método de efusión: Pérdida de peso	Sí	Sí	10-30%	—	De 10^{-3} Pa a 1 Pa	—
1.4.6. Método de saturación de gases	Sí	Sí	10-30%	Hasta el 50%	De 10^{-4} Pa 1 Pa (2)	—
1.4.7. Método de rotor	Sí	Sí	10-20%	—	De 10^{-4} Pa a 0,5 Pa	—

(1) Según el grado de pureza.
(2) Estos métodos pueden utilizarse también en el intervalo de 1 a 10 Pa siempre que se tenga cuidado.

1.6. DESCRIPCION DE LOS METODOS

1.6.1. Medida dinámica

1.6.1.1. *Aparato*

El equipo de medida típico consta de un recipiente de ebullición con refrigerante de vidrio o de metal (ver figura 1), un dispositivo de medida de la temperatura y un dispositivo de regulación y de medida de la presión. El equipo de medida representado en el esquema es de vidrio termorresistente y consta de cinco partes principales:

El tubo ancho con un tramo de doble pared tiene junta esmerilada, refrigerante, recipiente de enfriamiento y orificio de entrada.

El cilindro de vidrio unido a una bomba Cottrell está montado en la sección del tubo donde se efectúa la ebullición y tiene una superficie rugosa de vidrio triturado para evitar las sacudidas durante el proceso de ebullición.

Para medir la temperatura se puede utilizar un termosensor adecuado (por ejemplo, un termopar de camisa o un termómetro de resistencia) introducido en el aparato hasta el punto de medida (nº 5, figura 1) a través de una entrada adecuada (por ejemplo, junta esmerilada macho).

Se hacen las conexiones necesarias con el dispositivo de regulación y de medida de la presión.

El bulbo, que actúa como volumen-tampón, está conectado al aparato de medida a través de un tubo capilar.

Un elemento calefactor (por ejemplo, un calentador de cartucho) introducido en la parte inferior del aparato de vidrio, calienta el recipiente de ebullición. La corriente necesaria se establece y se regula por medio de un termopar.

La bomba de vacío produce el vacío necesario, entre 10^2 y aproximadamente 10^5 Pa.

Una válvula adecuada se utiliza para medir aire o nitrógeno con el fin de regular la presión (zona aproximada de medición: de 10^2 a 10^5 Pa) y de ventilar el aparato.

La presión se mide con un manómetro.

1.6.1.2. *Procedimiento de medida*

La presión de vapor se mide determinando el punto de ebullición de la muestra a diversas presiones específicas comprendidas entre 10^3 Pa y 10^5 Pa, aproximadamente. El punto de ebullición se alcanza cuando la temperatura se mantiene estable a presión constante. Este procedimiento de medida no es aplicable a las sustancias que formen espuma.

Se introduce la sustancia en el recipiente limpio y seco. Los sólidos no pulverulentos pueden presentar problemas, que a veces se resuelven calentando la camisa de refrigeración. Una vez lleno el recipiente, se cierra el aparato con la pestaña y se extrae el gas de la sustancia. Se regula a la presión más baja prevista y se acciona el sistema de calentamiento, conectando, simultáneamente, el termosensor a un registrador.

Cuando éste indique una temperatura de ebullición fija, a presión constante, se habrá alcanzado el equilibrio. Hay que evitar las sacudidas durante la ebullición. Además, debe obtenerse condensación completa en el refrigerante. Cuando se determina la presión de vapor de sólidos de bajo punto de fusión, hay que evitar que se bloquee el condensador.

Una vez registrado el punto de equilibrio, se regulará a una presión más elevada y se irá repitiendo de nuevo el mismo proceso hasta que se alcance una presión de 10^5 Pa (en total, de 5 a 10 medidas). Los puntos de equilibrio deben repetirse a presiones decrecientes para comprobar los resultados.

1.6.2. Medida estática

1.6.2.1. *Aparato*

El aparato se compone de un recipiente para la muestra, de un sistema de calentamiento y enfriamiento para llevar la muestra a la temperatura deseada, así como de un dispositivo para medir la temperatura. El aparato también incluye instrumentos para fijar y medir la presión. Las figuras 2a y 2b ilustran los principios básicos del aparato.

El compartimento que contiene la muestra (figura 2a) está unido, por una parte, a una llave de alto vacío y, por la otra, a un tubo en forma de U lleno de un líquido manométrico apropiado. Un extremo del tubo en U se ramifica para unirse a la bomba de vacío, a la bombona de nitrógeno o a la válvula de ventilación y a un manómetro.

En lugar de un tubo en U puede utilizarse un manómetro con indicador de presión (figura 2b).

Para poner la muestra a la temperatura deseada, se sumergen en un baño a temperatura constante ± 0,2 K, el compartimento de la muestra con la llave y el tubo en U o el manómetro. La temperatura se mide en la pared exterior del compartimento de la muestra o en el propio compartimento.

Para evacuar los gases del aparato se utilizará una bomba de vacío con purgador previo de enfriamiento.

En el método 2a, la presión de vapor de una sustancia se mide indirectamente con un indicador de cero. Esto tiene en cuenta el hecho de que la densidad del líquido en el tubo en U se altera si la temperatura cambia de forma importante.

Los siguientes líquidos pueden utilizarse como indicadores de cero para el tubo en U, según el intervalo de presiones y el comportamiento químico de la sustancia problema: aceites de silicona y ftalatos. La sustancia problema no debe disolverse de forma apreciable o reaccionar con el líquido del tubo U.

En el manómetro, el mercurio puede utilizarse en la zona desde la presión atmosférica hasta 10^2 Pa, los aceites de silicona y los ftalatos de 10^2 Pa a 10 Pa; en cuanto al manómetro de membrana calentable, puede utilizarse hasta a presiones inferiores a 10^{-1} Pa. También pueden utilizarse por debajo de 10^2 Pa otros tipos de manómetros.

1.6.2.2. *Métodos de medida*

Antes de medir, se limpian y se secan completamente todas las partes del aparato cuyo esquema aparece en la figura 2.

Para el método 2a, se llena el tubo en U con el líquido previsto, al que antes de realizar las lecturas se le ha extraído el gas a temperatura elevada.

Después de introducir la sustancia, se cierra el aparato y se enfría suficientemente para desgasificar. La temperatura debe ser suficientemente baja como para garantizar que se ha extraído el aire aunque, en el caso de sistemas multicomponenciales, no debe alterarse la composición del material. En caso necesario, el equilibrio puede alcanzarse más rápidamente por agitación.

La muestra puede subenfriarse, por ejemplo, con nitrógeno líquido (precaución: condensación de aire, líquido de la bomba) o una mezcla de etanol y hielo seco. Para las medidas a baja temperatura, úsese un baño termostatizado conectado a un ultracriomat.

Se abre la llave que hay sobre el recipiente de la muestra y se aplica una succión durante varios minutos para extraer el aire. Se cierra luego la llave y se reduce la temperatura de la muestra hasta el nivel más bajo que se desee. En caso necesario, la operación de desgasificado puede repetirse varias veces.

Al calentar la muestra aumenta la presión de vapor, lo que hace cambiar el equilibrio del líquido del tubo en U. Para compensar este fenómeno, hay que permitir la entrada de nitrógeno o aire en el aparato a través de una llave hasta que el líquido del manómetro esté otra vez a cero. La presión necesaria para conseguir este efecto puede leerse en un manómetro de precisión a temperatura ambiente y corresponde a la presión de vapor de la sustancia a esa temperatura concreta de medida.

El método 2b es similar pero la presión de vapor puede leerse directamente.

La relación de la presión de vapor con la temperatura se determina a pequeños intervalos adecuados (aproximadamente, entre 5 y 10 puntos de medida en total) hasta llegar al máximo previsto. Las lecturas a baja temperatura deben repetirse como comprobación.

Si los valores obtenidos en las lecturas repetidas no coinciden con la curva obtenida al ir aumentando las temperaturas, puede deberse a las causas siguientes:

1. La muestra sigue conteniendo aire (por ejemplo, materiales de elevada viscosidad) o sustancias de bajo punto de ebullición, que se liberan durante el calentamiento y pueden eliminarse mediante succión tras un mayor subenfriamiento.

2. La temperatura de enfriamiento no es bastante baja. En este caso se utiliza nitrógeno líquido como agente de enfriamiento.

   Si se trata de las causas 1 o 2, hay que repetir las medidas.

3. La sustancia sufre una reacción química en el intervalo de temperaturas investigado (por ejemplo, descomposición, polimerización).

1.6.3. Isoteniscopio

Para una descripción completa de este método, consultar la referencia 7. Los principios del aparato de medida están descritos en la figura 3. Como el método estático descrito en el punto 1.6.2., el isoteniscopio es aplicable a sólidos y a líquidos.

En el caso de los líquidos, la sustancia misma sirve de líquido de llenado para el manómetro auxiliar. Se pone en el isoteniscopio una cantidad de líquido suficiente para llenar el bulbo y el brazo corto de la sección manométrica. El isoteniscopio se une entonces al sistema de vacío; después de hacer el vacío en su interior, el isoteniscopio se llena de nitrógeno. La evacuación y la purga del sistema se repiten dos veces para eliminar el oxígeno residual. El isoteniscopio lleno se coloca en posición horizontal para que la muestra se extienda formando una fina capa en el bulbo de la muestra y en la sección manométrica (parte en U). La presión del sistema se reduce a 133 Pa y se calienta suavemente la muestra hasta que inicie la ebullición (eliminación de gases fijos disueltos). El isoteniscopio se cambia entonces de posición para que la muestra vuelva al bulbo y al brazo corto del manómetro, de forma que ambos queden totalmente llenos de líquido. La presión se mantiene al mismo nivel que para desgasificar; el extremo alargado del bulbo de la muestra se calienta con una pequeña llama hasta que el vapor originado por la muestra se expande suficientemente para desplazar parte de la muestra desde la porción superior del bulbo y del brazo del manómetro hacia la sección manométrica del isoteniscopio, creando así un espacio libre de nitrógeno y lleno de vapor.

El isoteniscopio se coloca entonces en un baño termostático y se ajusta la presión del nitrógeno hasta igualar a la presión de la muestra. El equilibrio de presiones viene indicado por la sección manométrica del isoteniscopio. En equilibrio, la presión de vapor del nitrógeno iguala a la presión de vapor de la sustancia.

En el caso de los sólidos, se utilizarán los líquidos manométricos citados en 1.6.2.1, según el intervalo de temperatura y presión. El líquido manométrico desgasificado se introduce en un engrosamiento del brazo largo del isoteniscopio. A continuación se introduce en el bulbo el sólido problema y se desgasifica a temperatura elevada. Después se inclina el isoteniscopio de forma que el líquido manométrico se introduzca en el tubo de U. La medida de la presión de vapor en función de la temperatura se realiza con arreglo al punto 1.6.2.

1.6.4. Método de efusión: Balanza de presión de vapor

1.6.4.1. *Aparato*

En la referencia 1 se encontrará la descripción de varios modelos de aparatos. El aparato representado en la figura 4 ilustra los principios generales del presente método. Esta figura muestra los principales componentes del aparato, que está formado por un recipiente de vidrio o de acero inoxidable resistente al vacío elevado, un equipo para producir y medir el vacío y componentes incorporados para medir la presión de vapor en una balanza. En el aparato se incluyen los siguientes componentes incorporados:

— un horno de evaporación con reborde y alimentador giratorio. Es un recipiente cilíndrico, hecho, por ejemplo, de cobre o de una aleación resistente químicamente con buena conductividad térmica. También puede utilizarse un recipiente de vidrio con pared de cobre. El horno tiene un diámetro aproximado de 3 a 5 cm y una altura de 2 a 5 cm. Está provisto de 1 a 3 aberturas de diferentes tamaños para la corriente de vapor. El calentamiento se efectúa o bien mediante una placa calefactora por debajo del horno o bien por una espiral calefactora alrededor del exterior del horno. Para evitar que se disipe calor a la placa de la base, el elemento calefactor se une a la placa de la base mediante un metal de baja conductividad térmica (níquel-plata o acero al cromo-níquel), por ejemplo, un tubo de níquel-plata unido a un alimentador giratorio si se utiliza un horno con varias aberturas. Esta disposición tiene la ventaja de permitir la introducción de una barra de cobre, lo que hace posible enfriar desde el exterior por medio de un baño refrigerante.

— Si la tapa del horno de cobre tiene tres aberturas de diferentes diámetros, situados a 90° uno de otro, pueden cubrirse varios intervalos de presión de vapor dentro del intervalo global de medida (aberturas con diámetros entre 0,30 y 4,50 mm, aproximadamente). Las aberturas grandes se utilizan para las presiones de vapor pequeñas y viceversa. Girando el horno puede ponerse la abertura deseada o una postura intermedia en la corriente de vapor (abertura del horno-escudo-platillo de balanza) y la corriente de moléculas se libera o se desvía a través de la abertura del horno hacia el platillo de la balanza. Para medir la temperatura de la sustancia se coloca en un lugar adecuado un termopar o un termómetro de resistencia.

— Por encima del escudo hay un platillo que forma parte de una microbalanza muy sensible (véase más abajo). El platillo de balanza tiene unos 30 mm de diámetro y puede estar hecho de aluminio dorado.

— El platillo de balanza está rodeado por un recinto cilíndrico de refrigeración de bronce o cobre. Según el tipo de balanza, este recinto tiene aberturas para el ástil de la balanza y una abertura con escudo para la corriente de moléculas, y debe garantizar la condensación completa del vapor en el platillo de balanza. La disipación de calor al exterior se realiza, por ejemplo, mediante una barra de cobre conectada al recinto de refrigeración. La barra pasa a través de la placa de la base y se aísla térmicamente de ésta, por ejemplo con un tubo de acero al cromo-níquel. La barra se introduce en un frasco Dewar con nitrógeno líquido bajo la placa de la base o se hace circular nitrógeno líquido a través de la barra. De esta manera, la temperatura de la barra se mantiene a −120 °C aproximadamente. El platillo de la balanza se enfría exclusivamente por radiación, lo que es válido para el intervalo de presiones estudiadas (el enfriamiento debe iniciarse alrededor de 1 hora antes de que empiece la medición).

— La balanza se coloca por encima del recinto de refrigeración. Como ejemplos de balanzas adecuadas pueden citarse una microbalanza electrónica muy sensible de 2 brazos (8) o un instrumento de bobina móvil (véase la Test Guideline 104 de la OCDE, edición de 12.05.81).

— La placa de base también lleva conexiones eléctricas para los termopares (o termómetros de resistencia) y resistencias calefactoras.

— El vacío en el recipiente se produce por medio de una bomba de vacío parcial o una bomba de alto vacío (el vacío necesario es, aproximadamente, de 1 a 2 . 10^{-3} Pa, después de 2 h de bombeo). La presión se regula con un manómetro adecuado de ionización.

1.6.4.2. *Método de medida*

El receptáculo se llena con la sustancia problema y se cierra la tapa. El escudo y el recinto de refrigeración se deslizan encima del horno. Se cierra el aparato y se conectan las bombas de vacío. La presión final antes de empezar a tomar medidas debe ser aproximadamente 10^{-4} Pa. El enfriamiento del recinto de refrigeración se iniciará a 10^{-2} Pa.

Una vez obtenido el vacío necesario, se inicia la serie de calibración a la temperatura mínima exigida. Se pone la abertura correspondiente de la tapa, la corriente de vapor pasa a través del escudo directamente a la parte superior y choca con el platillo enfriado de la balanza. Este platillo debe ser bastante grande para garantizar que choca contra él todo el chorro de vapor llegado a través del escudo. El momento de la corriente de vapor actúa como una fuerza contra el platillo de la balanza y las moléculas se condensan en su superficie enfriada.

El momento y la condensación simultánea producen una señal en el registrador. La evaluación de las señales proporciona dos datos:

1. En el aparato aquí descrito, la presión de vapor se determina directamente a partir del momento sobre el platillo de la balanza [para esto no es necesario conocer el peso molecular (2)]. Para evaluar las lecturas hay que tener en cuenta factores geométricos, como la abertura del horno y el ángulo de la corriente de moléculas.

2. La masa del condensado puede medirse a la vez y, a partir de este dato, puede calcularse la velocidad de evaporación. La presión de vapor puede calcularse también a partir de la velocidad de evaporación y del peso molecular mediante la ecuación de Hertz (2):

$$p = G \sqrt{\frac{2 \pi RT \times 10^3}{M}}$$

donde

G = velocidad de evaporación (kg s^{-1} m^{-2})

M = masa molecular (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = constante universal molar de los gases (J $mol^{-1}K^{-1}$)

p = presión de vapor (Pa)

Cuando se consigue el vacío necesario, se inicia la serie de medidas a la temperatura más baja prevista.

En las medidas siguientes, se aumenta la temperatura a pequeños intervalos hasta el momento en que se consiga la temperatura más alta prevista. Entonces se enfría la muestra una vez más y puede registrarse una segunda curva de presión de vapor. Si esta segunda serie no confirma los resultados de la primera, es posible que la sustancia se descomponga en el intervalo de temperatura que se utiliza en la determinación.

1.6.5. **Método de efusión: Pérdida de peso**

1.6.5.1. *Aparato*

El aparato de efusión consta de las siguientes partes básicas:

— un recinto que puede termostatizarse y someterse a vacío, donde se sitúan las células de efusión;

— una bomba de alto vacío (por ejemplo, bomba de difusión o bomba turbomolecular), con un manómetro de vacío;

— un sifón, con nitrógeno líquido o hielo seco.

Como ejemplo, se presenta en la figura 5 un recinto de aluminio, calentado eléctricamente y que puede someterse a vacío, con 4 células de efusión de acero inoxidable. La hoja de acero inoxidable de unos 0,3 mm de grosor tiene un orificio de efusión de 0,2 a 1,0 mm de diámetro y está unida a la célula de efusión por una tapa de rosca.

1.6.5.2. *Método de medida*

Las sustancias problema y de referencia se ponen en cada célula de efusión, el diafragma metálico con el orificio se sujeta con la tapa de rosca y se pesa cada célula con precisión de 0,1 mg. Se coloca la célula en el aparato termostatizado, que se somete a vacío hasta alcanzar una presión por debajo de un décimo de la presión prevista. A intervalos determinados entre 5 y 30 horas se deja entrar aire en el aparato, y la pérdida de masa de la célula de efusión se determina repitiendo la pesada.

Con el fin de garantizar que los resultados no se alteran por la presencia de impurezas volátiles, se vuelve a pesar la célula a intervalos determinados para confirmar que la velocidad de evaporación es constante al menos durante dos intervalos de tiempo.

La presión de vapor p en la célula de efusión viene dada por:

$$p = \frac{m}{KAt}\sqrt{\frac{2\pi R T}{M}}$$

donde

p = presión de vapor (Pa)

m = masa de sustancia que sale de la célula durante el tiempo t (kg)

t = tiempo (s)

A = área del orificio (m^2)

K = factor de corrección

R = constante universal de los gases (J $mol^{-1}K^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = masa molecular (kg mol^{-1})

El factor de corrección K depende de la relación entre la longitud y el radio del orificio cilíndrico:

relación:	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K:	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

La ecuación anterior puede escribirse:

$$p = E\ \frac{m}{t}\sqrt{\frac{T}{M}}$$

donde $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\pi R}$ es la constante de la célula de efusión

Esta constante de la célula de efusión E puede determinarse con sustancias de referencia (2,9) según la siguiente ecuación:

$$E = \frac{p(r)\ t}{m}\sqrt{\frac{M(r)}{T}}$$

donde

p(r) = presión de vapor de la sustancia de referencia (Pa)

M(r) = masa molecular de la sustancia de referencia (kg.mol^{-1})

1.6.6. **Método de saturación de gases**

1.6.6.1. *Aparato*

El aparato utilizado en el presente método se compone típicamente de cierto número de elementos que se representan en la figura 6a y se describen a continuación (1).

Gas inerte:

El gas de arrastre no debe reaccionar químicamente con la sustancia problema. El nitrógeno sirve en la mayoría de los casos pero, a veces, pueden ser necesarios otros gases (10). El gas elegido debe estar seco (véase el número 4 de la figura 6a: sonda de humedad relativa).

Control de flujo gaseoso:

Un sistema adecuado de control de gases es indispensable para lograr un flujo constante y determinado a través de la columna de saturación.

Colectores de vapor:

Su elección depende de las características de la muestra, así como del método de análisis utilizado. El vapor debe recogerse cuantitativamente y de manera que permita el análisis posterior. Con determinadas sustancias, se utilizarán colectores con líquidos como el hexano o el etilenglicol. Con otras, se podrán utilizar absorbentes sólidos.

Como alternativa a la recogida de vapor y su análisis posterior, pueden utilizarse técnicas analíticas incorporadas en serie, como la cromatografía, para determinar la cantidad de material arrastrado por una cantidad conocida de gas de arrastre. Además, puede medirse la pérdida de masa de la muestra.

Intercambiador de calor:

Para determinaciones a diferentes temperaturas, quizá sea necesario incluir en el aparato un intercambiador de calor.

Columna de saturación

La sustancia problema se deposita a partir de una solución sobre un soporte inerte, que se introduce una vez recubierto en la columna de saturación. Las dimensiones de ésta y la velocidad de salida deben elegirse de forma que garanticen la saturación completa del gas de arrastre. La columna debe estar termostatizada. En las determinaciones efectuadas a temperaturas superiores a la del ambiente, se debe calentar el espacio entre la columna y los colectores para impedir la condensación de la sustancia.

Con el fin de disminuir el arrastre de masa debido a la difusión, puede colocarse un capilar tras la columna de saturación (figura 6b).

1.6.6.2. *Método de medida*

Preparación de la columna de saturación:

Una vez disuelta en un disolvente muy volátil, parte de la sustancia se añade a un volumen adecuado de material de soporte. La cantidad de sustancia añadida debe ser suficiente para mantener la saturación durante todo el ensayo. El disolvente se evapora por completo al aire o en un rotavapor y se introduce el material bien homogeneizado en la columna. Una vez termostatizada la muestra, se hace pasar a través del aparato una corriente de nitrógeno seco.

Medida:

Se conectan los colectores o el detector incorporado en serie al tubo de salida de la columna y se registra el tiempo. Se comprueban la velocidad de flujo al comienzo de la experiencia y a intervalos regulares durante la misma, mediante un medidor de flujo de burbuja (o también, de forma continua, con uno de masa).

Debe medirse la presión a la salida de la columna de saturación:

a) intercalando un indicador de presión entre el saturador y los colectores (esto puede no ser adecuado por el aumento del espacio muerto y de la superficie de adsorción); o bien

b) determinando los descensos de presión a través del sistema de recogida utilizado, en función de la velocidad de flujo en una prueba aparte (este método puede resultar poco satisfactorio en los colectores de líquido).

El tiempo que se precise para recoger la cantidad de sustancia necesaria para los distintos métodos de análisis se determina durante ensayos preliminares o por estimación. Como alternativa a la recogida de sustancia problema para su análisis posterior, puede utilizarse alguna técnica analítica cuantitativa incorporada (por ejemplo, la cromatografía). Antes de calcular la presión de vapor a una temperatura dada, conviene efectuar pruebas preliminares para determinar la velocidad de flujo máxima a la que el gas de arrastre se satura completamente con vapor de la sustancia. Esto queda garantizado si el gas de arrastre pasa a través del saturador con la suficiente lentitud para que una velocidad más reducida no determine una presión de vapor calculada mayor.

La elección del método de análisis estará en función de la naturaleza de la sustancia que se vaya a ensayar (por ejemplo, cromatografía en fase gaseosa o gravimetría).

Se determina la cantidad de sustancia transportada por un volumen conocido de gas de arrastre.

1.6.6.3. *Cálculo de la presión de vapor*

La presión de vapor se calcula a partir de la densidad del vapor (W/V), por medio de la ecuación siguiente:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

donde

p = presión de vapor (Pa)

W = masa de sustancia problema evaporada (g)

V = volumen de gas saturado (m^3)

R = constante universal molar de los gases ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = masa molar de la sustancia problema ($g\ mol^{-1}$)

Los volúmenes medidos deben corregirse para tener en cuenta las diferencias de presión y temperatura entre el medidor de flujo y el saturador termostatizado. Si el medidor de flujo está situado después del colector de vapor, pueden ser necesarias ciertas correcciones para tener en cuenta la evaporación de productos contenidos en los colectores (1).

1.6.7. Rotor (8, 11, 13)

1.6.7.1. *Aparato*

La técnica de rotor puede aplicarse utilizando un viscosímetro de rotor como el que se muestra en la figura 8. En la figura 7 aparece un esquema de montaje experimental.

El aparato de medida consiste típicamente en una cabeza de medida de rotor, incluida en un recinto termostatizado (regulado con una precisión de 0,1 °C). El recipiente con la muestra se coloca en un recinto termostatizado (regulado con una precisión de 0,01 °C) y todas las demás partes del montaje se mantienen a una temperatura superior con el fin de evitar la condensación. Una bomba de alto vacío se conecta al sistema por medio de llaves de alto vacío.

La cabeza de medida de rotor consiste en una bola de acero (de 4 a 5 mm de diámetro) dentro de un tubo. La bola se suspende y estabiliza en un campo magnético, generalmente mediante la combinación de imanes permanentes y de bobinas de control.

Se hace girar la bola por campos giratorios producidos por las bobinas. Unas bobinas de recepción, que miden la magnetización continua, baja y lateral de la bola hacen que se pueda medir la velocidad de giro.

1.6.7.2. *Método de medida*

Cuando la bola alcanza una velocidad angular dada v(o) (generalmente, unas 400 revoluciones por segundo), se interrumpe la activación y se produce el frenado debido a la fricción con el gas.

El descenso de la velocidad angular se mide en función del tiempo. Como la fricción causada por la suspensión magnética es despreciable en comparación con la fricción por el gas, la presión p del gas viene dada por la siguiente fórmula:

$$p = \frac{\pi\, \bar{c} r\, \rho}{\sigma\, 10\, t} \times \ln \frac{v(t)}{v(o)}$$

donde

$\bar{c}$ = velocidad media de las moléculas del gas

r = radio de la bola

ρ = densidad másica de la bola

σ = coeficiente de transferencia del momento tangencial (σ = 1 para superficie esférica ideal de la bola)

t = tiempo

v(t) = velocidad angular al cabo del tiempo t

v(o) = velocidad angular inicial

Esta ecuación puede escribirse también:

$$p = \frac{\pi\, \bar{c} r\, \rho}{10\, \sigma} \times \frac{t_n - t_{n-1}}{t_n \times t_{n-1}}$$

donde t_n y t_{n-1} son los tiempos necesarios para que se dé un número N determinado de revoluciones. Estos intervalos de tiempo, t_n y t_{n-1}, son sucesivos y $t_n > t_{n-1}$.

La velocidad media Ec de las moléculas de gas es:

$$\bar{c} = \left(\frac{8\, RT}{\pi\, M} \right)^{\frac{1}{2}}$$

donde

T = temperatura

R = constante universal molar de los gases

M = masa molar

2. RESULTADOS

Cualquiera que sea el método elegido, la presión de vapor debe determinarse, al menos, a dos niveles de temperatura. Son preferibles tres niveles, o más, entre 0 °C y 50 °C, para comprobar la linealidad de la curva de la presión de vapor.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— dos valores al menos de presión de vapor y temperatura, preferentemente entre 0 y 50 °C,

— todos los datos originales,

— una gráfica de log p frente a 1/T,

— una estimación de la presión de vapor a 20 o 25 °C.

En caso de transición (cambio de estado, descomposición), hay que incluir:

— descripción del cambio,

— temperatura a la que se produce la presión atmosférica,

— presión de vapor a 10 y a 20 °C por debajo de la temperatura de transición, así como a 10 y 20 °C por encima de dicha temperatura (excepto en el caso de transición del estado sólido al estado gaseoso).

Deben señalarse todas las informaciones y observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981 Test Guideline 104, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Ambrose, B. Le Neindre, B.; B. Vodar, (Eds.): Experimental Thermodynamics, Butterworths, Londres, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Chapter IX, Interscience Publ., Nueva York, 1959, Vol. I, Part I.

(4) Knudsen, M. Ann. Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; vol. 34, 593.

(5) NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

(6) NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapor pressure balance method.

(7) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure- temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(8) G. Messer, P. Röhl, G. Grosse y W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, vol. 5, (4), 2440.

(9) Ambrose, D.; Lawrenson, I..; Sprake, C.H.S. J. Chem. Thermodynamics 1975, vol. 7, 1173.

(10) B.F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, vol. 85, 435.

(11) G. Comsa, J.K. Fremerey y B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, vol. 17 (2), 642.

(12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, vol. 20 (4), 1148

(13) J.K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1985, vol. 3 (3), 1715.

Apéndice 1

Método de estimación

INTRODUCCIÓN

Los valores calculados de presión de vapor pueden utilizarse:

— para decidir cuál de los métodos experimentales es el adecuado,

— para dar un valor estimado o un valor límite en casos en que el método experimental no pueda aplicarse por causas técnicas (incluida la extrema debilidad de la presión de vapor),

— para contribuir a señalar aquellos casos en que la omisión de la medida experimental se justifica por la probabilidad de que la presión de vapor sea $< 10^{-5}$ Pa a temperatura ambiente.

MÉTODO DE ESTIMACIÓN

La presión de vapor de los sólidos y líquidos puede estimarse con la correlación modificada de Watson (a). El único dato experimental necesario es el punto normal de ebullición. El método puede aplicarse en el intervalo de presiones de 10^{5} Pa a 10^{-5} Pa.

En el «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» viene información detallada sobre el método (b).

CÁLCULO

Según (b), la presión de vapor se calcula de la forma siguiente:

$$\ln P_{vp} = \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{(3 - 2\frac{T}{T_b})^m}{\frac{T}{T_b}} - 2\,m\,(3 - 2\frac{T}{T_b})^{m-1}\ln\frac{T}{T_b}\right]$$

donde

T = temperatura correspondiente

T_b = punto normal de ebullición

P_{vp} = presión de vapor a la temperatura T

ΔH_{vp} = calor de vaporización

ΔZ_b = factor de compresibilidad (estimado en 0,97)

m = factor empírico que depende del estado físico a la temperatura correspondiente

Además,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\,(8{,}75 + R\ln T_b)$$

donde K_F es un factor empírico que tiene en cuenta la polaridad de la sustancia. La referencia (b) da los factores K_F de varios tipos de compuestos.

Es bastante frecuente tener datos en que figura un punto de ebullición a presión reducida. En estos casos, según (b), la presión de vapor se calcula con arreglo a la fórmula:

$$\ln P_{vp} = \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - (3 - 2\frac{T}{T_1})^m\frac{T_1}{T} - 2\,m\,(3 - 2\frac{T}{T_1})^{m-1}\ln\frac{T}{T_1}\right]$$

donde T1 es el punto de ebullición a la presión reducida P1.

INFORME

Cuando se siga el método de estimación, el informe incluirá una extensa documentación de los cálculos.

BIBLIOGRAFÍA

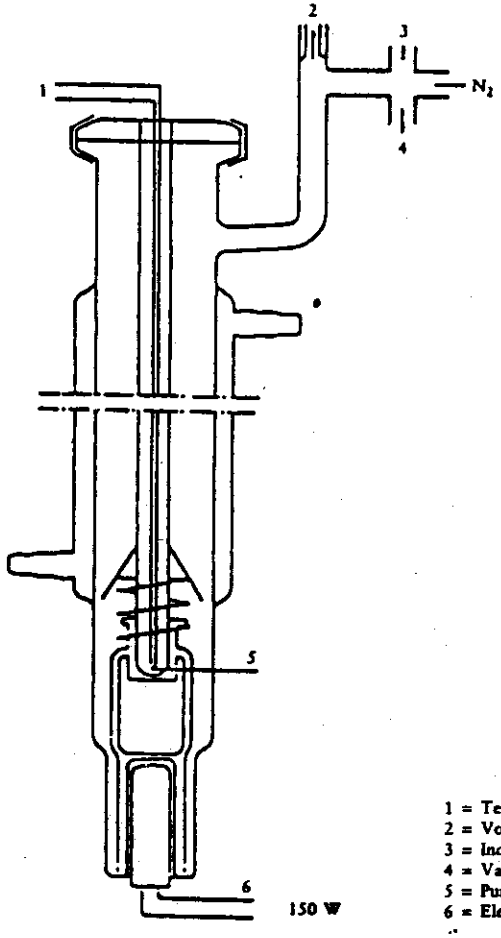
(a) K. M. Watson, Ind. Eng. Chem., 1943, vol. 35, 398.

(b) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982.

Apéndice 2

Figura 1

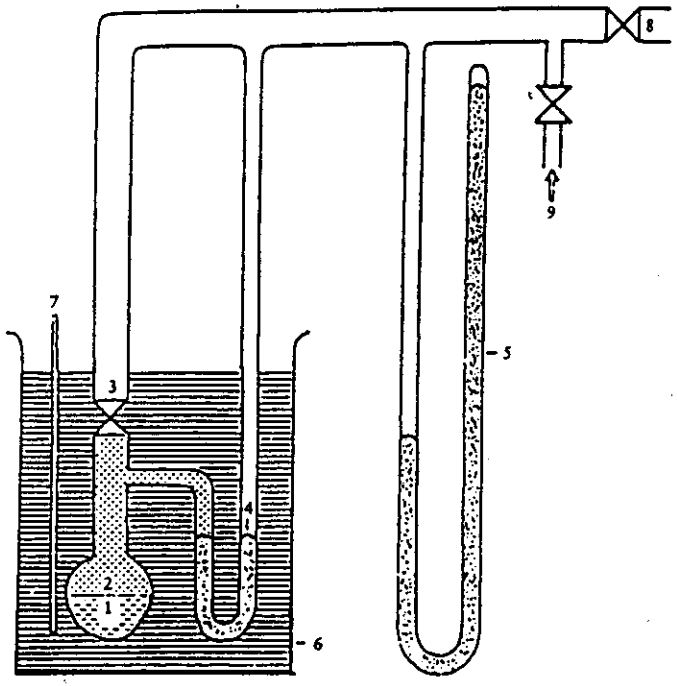
Aparato para determinar la curva de presión de vapor, según el método dinámico



1 = Termopar
2 = Volumen tampón
3 = Indicador de presión
4 = Vacío
5 = Punto de medida
6 = Elemento de calor de unos 150 W

Figura 2a

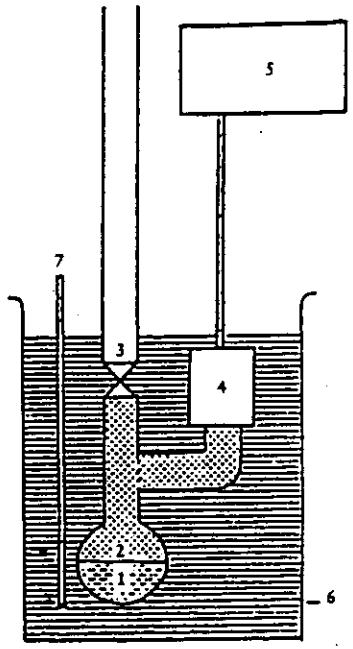
Aparato para determinar la curva de presión de vapor según el método estático (con manómetro de tubo en U)



1. Muestra problema
2. Fase de vapor
3. Llave de alto vacío
4. Tubo en U (manómetro auxiliar)
5. Manómetro
6. Baño a temperatura constante
7. Termómetro
8. A la bomba de vacío
9. Ventilación

Figura 2b

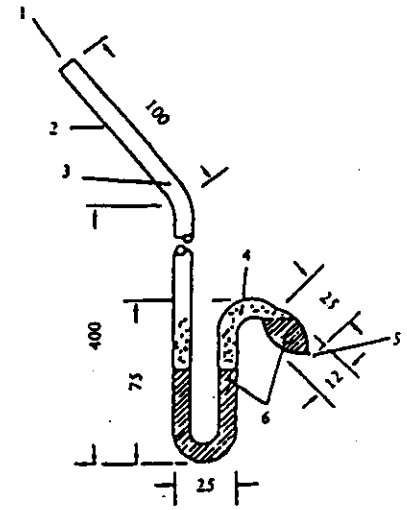
Aparato para determinar la curva de presión de vapor según el método estático (con indicador de presión)



1. Sustancia problema
2. Fase de vapor
3. Llave de alto vacío
4. Manómetro
5. Indicador de presión
6. Baño a temperatura constante
7. Termómetro

Figura 3

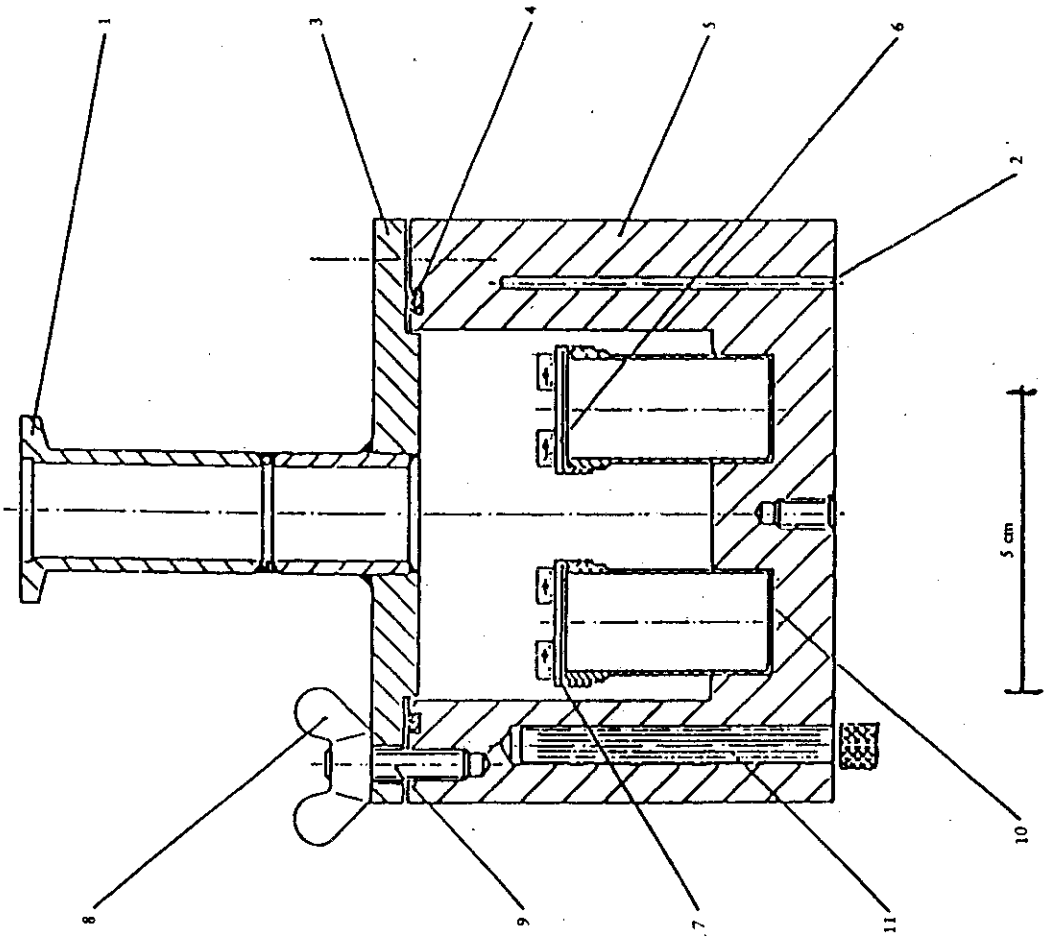
Isoteniscopio (véase la referencia 2)



1. Al sistema de control y medida de la presión
2. Tubo de 8 mm de diámetro exterior
3. Nitrógeno seco en el sistema de presión
4. Vapor de la muestra
5. Brazo corto6. Muestra líquida

Figura 5

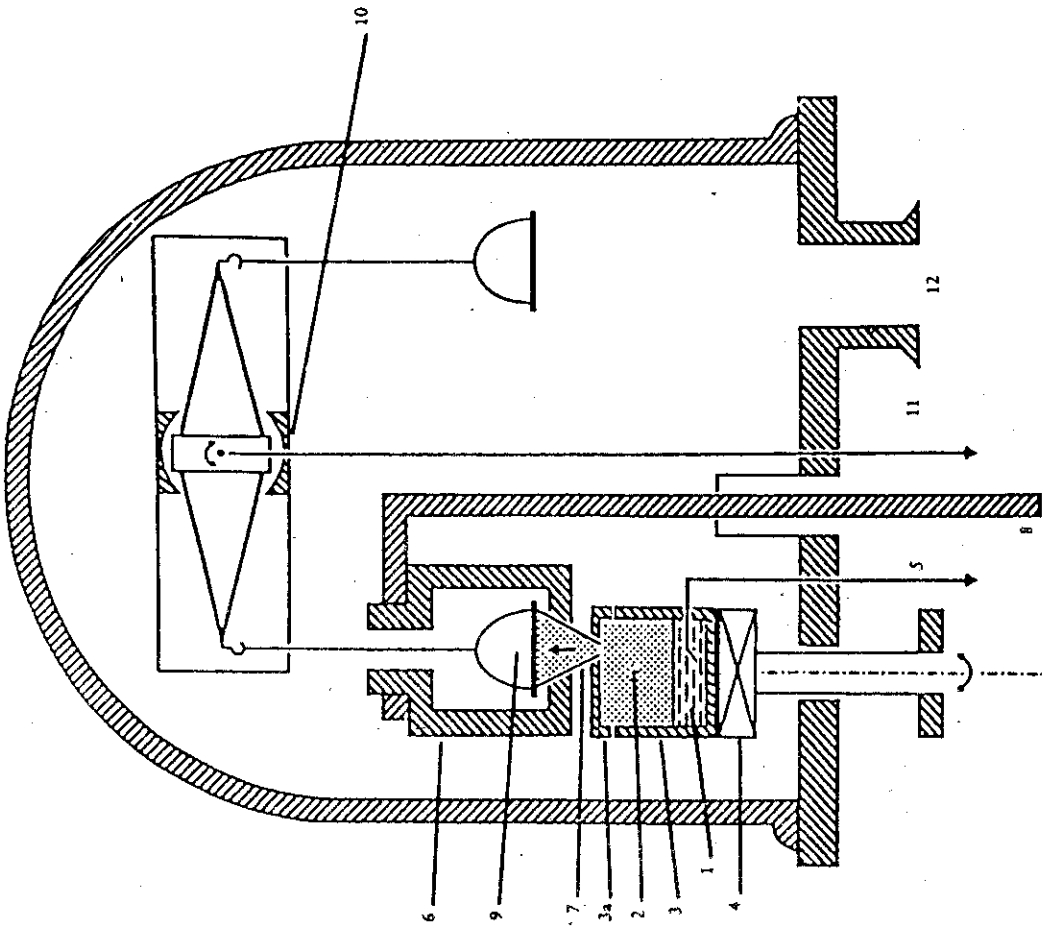
Ejemplo de aparato de evaporación a baja presión por el método de efusión, con una célula de efusión de 8 cm³ de volumen



1 Conexión al vacío
2 Espacios para el termómetro de resistencia de platino o medida y control de la temperatura (2)
3 Tapa del recinto de vacío
4 Toro
5 Recinto de aluminio para hacer el vacío
6 Dispositivo para instalar y quitar las células de efusión
7 Tapa de rosca
8 Tuercas de mariposa (6)
9 Pernos (6)
10 Células de efusión de acero inoxidable
11 Cartuchos calefactores (6)

Figura 4

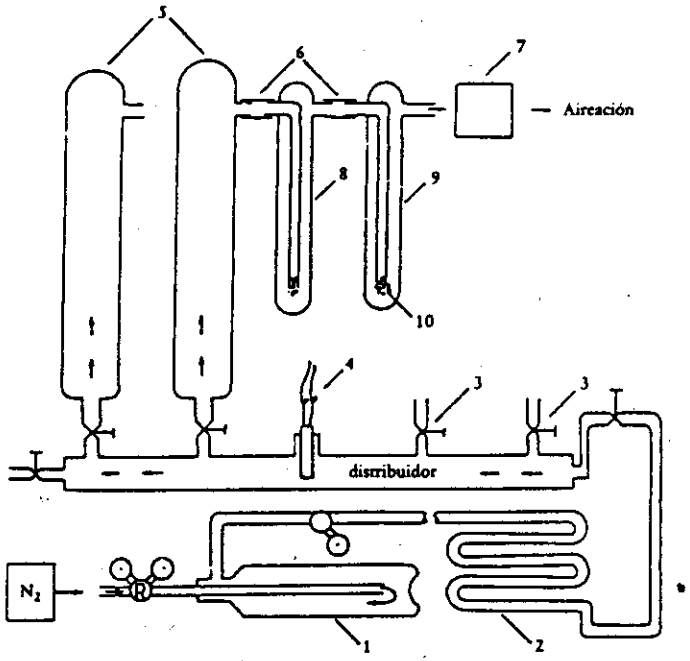
Aparato para determinar la curva de presión de vapor, según el método de la balanza de presión de vapor



1. Sustancia problema
2. Fase de vapor con corriente de vapor
3. Horno de evaporación con alimentación giratoria
3a. Tapa del horno con abertura
4. Calefacción (refrigeración) del horno
5. Medida de la temperatura de la muestra
6. Recinto de refrigeración
7. Escudo
8. Barra de refrigeración para el recinto de refrigeración
9. Platillo de balanza
10. Microbalanza
11. Al registrador
12. A la bomba de alto vacío

Figura 6a

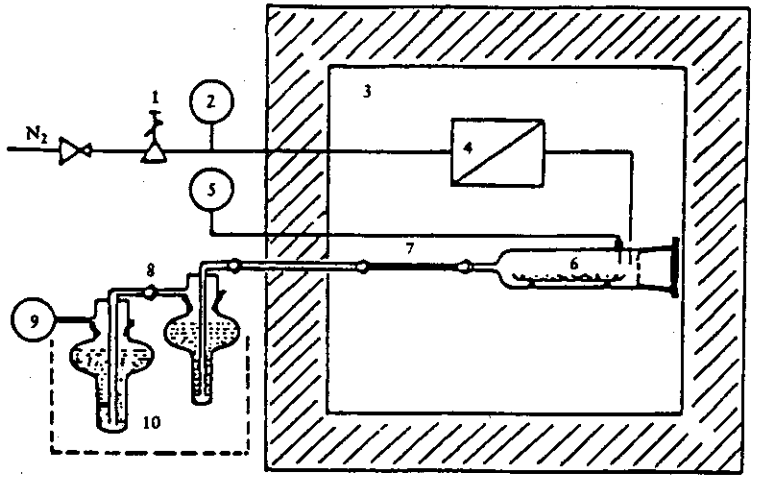
Modelo de aparato que permite determinar la presión de vapor, por el método de saturación de gases



1 = Regulador de flujo
2 = Intercambiador de calor
3 = Válvulas de aguja
4 = Sonda de humedad relativa
5 = Columnas de saturación
6 = Juntas PFTE
7 = Medidor de flujo
8 = Colector (absorbente)
9 = Colector (aceite)
10 = Medidor de flujo de burbuja

Figura 6b

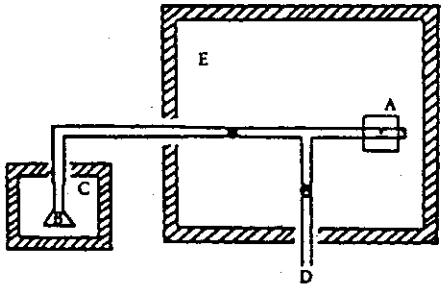
Modelo de aparato para la determinación de la presión de vapor por el método de saturación de gases, con un capilar tras la cámara de saturación



1. Medidor térmico de flujo de masa
2. Manómetro
3. Cámara termostatizada
4. Bobina termostatizadora para el gas de arrastre
5. Termómetro (Pt 100)
6. Cámara de saturación de gases
7. Capilar
8. Recipientes de absorción
9. Contador de gas
10. Colector en frío

Figura 7

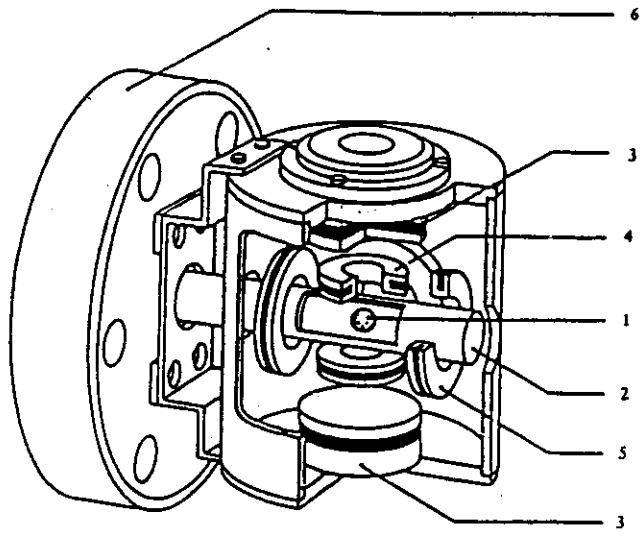
Ejemplo de montaje experimental para el método del rotor



Aparato de presión de vapor
A. Cabeza de medida de rotor;
B. Recipiente de la muestra;
C. Termostato;
D. Al vacío (turbobomba);
E. Termostato de aire

Figura 8

Ejemplo de cabeza de medida de rotor



1. Bola;
2. Extensión tubular al vacío de 6
3. Imanes permanentes (2);
4. Bobinas (2) para la estabilización vertical;
5. Bobinas motrices (4);
6. Plato de conexión.

A.5. TENSIÓN SUPERFICIAL

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en la referencia (2).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos descritos se aplican a la medida de la tensión superficial de las soluciones acuosas.

Antes de efectuar el ensayo, es conveniente disponer de información preliminar sobre la solubilidad en el agua, la estructura, las propiedades de hidrólisis y la concentración crítica para la formación de micelas de la sustancia.

Los siguientes métodos son aplicables a la mayor parte de las sustancias químicas, cualquiera que sea su grado de pureza.

Las medidas de la tensión superficial por el método del tensiómetro de anillo se limita a las soluciones acuosas con una viscosidad dinámica inferior a 200 mPa s, aproximadamente.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La entalpía de superficie libre por unidad de superficie constituye la tensión superficial.

Esta última se expresa en:

N/m (en unidades SI) o

mN/m (en subunidades SI)

1 N/m = 10^3 dinas/cm

1 mN/m = 1 dina/cm en el sistema CGS (en desuso).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una sustancia nueva. Se deben utilizar esencialmente para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

En las referencias (1) y (3) se señalan sustancias de referencia que cubren una amplia gama de tensiones superficiales.

1.4. PRINCIPIOS DE LOS MÉTODOS

Los métodos se basan en la medida de la fuerza máxima que es preciso ejercer verticalmente sobre una brida o anillo en contacto con la superficie del líquido estudiado, colocado en un recipiente adecuado, a fin de separarlo de dicha superficie, o sobre una placa, uno de cuyos bordes esté en contacto con la superficie, a fin de elevar la película formada.

Las sustancias que sean hidrosolubles al menos a la concentración de 1 mg/l se someterán al ensayo en solución acuosa a una sola concentración.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La precisión de los métodos descritos es mayor de la que normalmente se requiere en la evaluación del riesgo para el medio ambiente.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Se prepara una solución de la sustancia en agua destilada. La concentración de esta solución debe ser el 90 % de la concentración de saturación de la sustancia en agua; si esta concentración es superior a 1 g/l, se utilizará para el ensayo la concentración de 1 g/l. Las sustancias cuya solubilidad en agua es inferior a 1 mg/l no tienen que someterse al ensayo.

1.6.1. **Método de la placa**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.2. **Método de la brida**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.3. **Método del anillo**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.4. **Método del anillo armonizado por la OCDE**

1.6.4.1. *Aparato*

Para efectuar esta medida pueden emplearse tensiómetros comerciales. Constan de los elementos siguientes:

— un portamuestras móvil,

— un dinamómetro,

— un cuerpo de medida (anillo),

— un recipiente de medida.

1.6.4.1.1. Portamuestras móvil

El portamuestras móvil sirve de soporte al recipiente de medida termostatizado, que contiene el líquido problema. Va montado en la misma peana que el dinamómetro.

1.6.4.1.2. Dinamómetro

El dinamómetro (véase la figura) va colocado por encima del portamuestras. El error en la medida de la fuerza no debe pasar de $\pm 10^{-6}$ N, lo que equivale a un límite de error de $\pm$ 0,1 mg en una medida de masa. En la mayoría de los casos, la escala de medidas de los tensiómetros vendidos en el mercado está calibrada en mN/m, de manera que se puede leer directamente la tensión superficial en mN/m con una precisión de 0,1 mN/m.

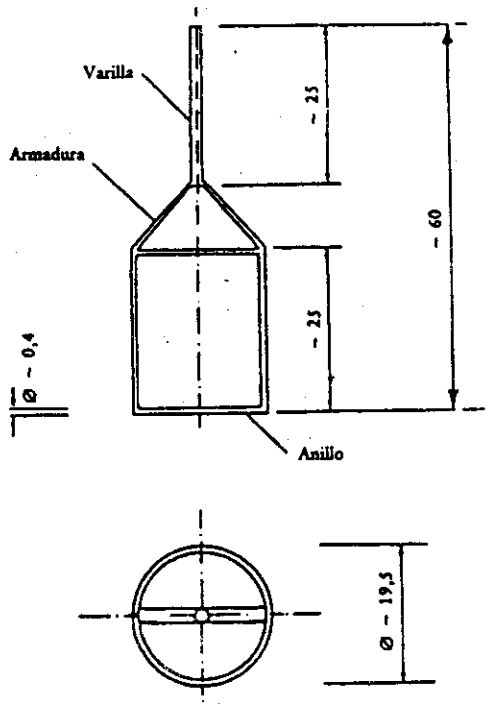
1.6.4.1.3. Cuerpo de medida (anillo)

El anillo suele estar formado por un hilo de platino-iridio de 0,4 mm de grosor, aproximadamente, y una circunferencia media de 60 mm. Dicho anillo está suspendido horizontalmente de una armadura que va unida por una varilla metálica al dinamómetro (véase la figura).

Figura

Cuerpo de medida

(todas las dimensiones se expresan en milímetros)



1.6.4.1.4. Recipiente de medida

El recipiente de medida que contiene la solución problema debe ser un recipiente de vidrio termostatizado. Debe estar diseñado de manera que, durante la determinación, la temperatura del líquido y de la fase gaseosa por encima de su superficie se mantenga constante y no haya evaporación. Los recipientes cilíndricos de vidrio de un diámetro interior de, al menos, 45 mm cumplen estos requisitos.

1.6.4.2. *Preparación del aparato*

1.6.4.2.1. Limpieza

Los recipientes de vidrio deben limpiarse con cuidado. Si es necesario se lavarán con mezcla sulfocrómica caliente y, a continuación, con ácido fosfórico viscoso (83 a 98 % en peso de H_3PO_4); se enjuagarán abundantemente con agua corriente y luego con agua bidestilada hasta el momento en que se obtenga reacción neutra; finalmente, se secarán o bien se enjuagarán con parte del líquido que se va a medir.

El anillo se limpiará con abundante agua para eliminar todos los restos de sustancias solubles en agua, se sumergerá unos segundos en mezcla sulfocrómica, se enjuagará con agua bidestilada hasta que se obtenga reacción neutra y, finalmente, se secará rápidamente sobre una llama de metanol.

Nota:

Los restos de sustancias que no se disuelvan ni se destruyan con la mezcla sulfocrómica ni con el ácido fosfórico, como las siliconas, deberán ser eliminadas con un disolvente orgánico apropiado.

1.6.4.2.2. Calibrado del aparato

La validación del aparato consiste en comprobar el punto cero y en ajustarlo de tal manera que la indicación dada por el aparato permita una determinación fiable en mN/m.

Montaje:

Se nivelará el aparato, por ejemplo con un nivel de burbuja colocado sobre la peana y con tornillos de nivelación.

Ajuste del punto cero:

Después de montar el anillo en el aparato y antes de sumergirlo en el líquido, debe ajustarse a cero el indicador del tensiómetro y comprobarse el paralelismo del anillo con la superficie del líquido. A tal fin, puede utilizarse la superficie del líquido como espejo.

Calibrado:

El calibrado en sí del aparato puede hacerse con uno de los dos métodos siguientes:

a) con una masa: este procedimiento consiste en utilizar contrapesos de masa conocida (entre 0,1 g y 1,0 g), que se colocan sobre el anillo. El factor de calibrado θ_a, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del instrumento, se determina mediante la ecuación (1):

$$\phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

donde

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masa del contrapeso (g)

g = aceleración de la gravedad (981 cm.s^{-2} a nivel del mar)

b = circunferencia media del anillo (cm)

σ_a = lectura del tensiómetro tras colocación del contrapeso sobre el anillo (mN/m);

b) con agua: este procedimiento utiliza agua pura cuya tensión superficial, por ejemplo a 23 °C, es igual a 72,3 mN/m. Es más rápido que el sistema anterior, pero siempre existe el riesgo de que la tensión superficial del agua se vea modificada por restos de tensioactivos.

El factor de calibrado Φ_b, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del aparato, se determina mediante la ecuación siguiente (2);

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

donde

σ_o = valor dado en la bibliografía para la tensión superficial del agua (mN/m) a la temperatura elegida para el ensayo

σ_g = valor medido de la tensión superficial del agua (mN/m) a esa misma temperatura.

1.6.4.3. *Preparación de la muestra*

Las soluciones acuosas de la sustancia se prepararán teniendo en cuenta las concentraciones exigidas. Es imprescindible que la disolución de la sustancia sea completa.

La solución así preparada debe mantenerse a una temperatura constante (± 0,5 °C). Dado que la tensión superficial de una solución colocada en el recipiente de medida se modifica después de cierto tiempo, deben efectuarse varias medidas en momentos diferentes y hay que trazar una curva de la tensión superficial en función del tiempo. Cuando ya no haya modificaciones, se habrá alcanzado un estado de equilibrio.

El polvo o los vapores de otras sustancias falsean la medida. La operación debe realizarse bajo una campana de protección.

1.6.5. **Condiciones del ensayo**

Las medidas deben efectuarse a una temperatura de unos 20 °C, sin variaciones de temperatura superiores a ± 0,5 °C.

1.6.6. **Desarrollo del ensayo**

Se vierte en el recipiente de medida, cuidadosamente limpio, la solución que se desea medir, procurando evitar la formación de burbujas y, a continuación, se coloca el recipiente de medida en el portamuestras, elevándolo hasta que el anillo quede sumergido bajo la superficie de la solución. Entonces se vuelve a bajar gradual y uniformemente (a una velocidad de unos 0,5 cm/min) el portamuestras para separar el anillo de la superficie hasta llegar a la fuerza máxima. La capa de líquido adherida al anillo no debe desprenderse de éste. Una vez acabada la medida, se sumerge de nuevo el anillo y se repiten las medidas hasta que se obtenga un valor de tensión superficial constante. En cada determinación se anotará el tiempo que haya transcurrido desde la transferencia de la solución al recipiente de medida. Las lecturas deben registrarse en el valor máximo de la fuerza necesaria para retirar el anillo de la superficie del líquido.

2. **RESULTADOS**

Para calcular la tensión superficial se multiplicará primero el valor leído en el aparato en mN/m por el factor de calibrado Φ_a o Φ_b (según el procedimiento de calibrado utilizado). Se obtendrá entonces un valor sólo aproximado que, a continuación, deberá corregirse.

Harkins y Jordan (4) han establecido de manera empírica factores de corrección para los valores de tensión superficial obtenidos por el método del anillo, que dependen de las dimensiones del anillo, de la densidad del líquido y de su tensión superficial.

Dada la laboriosidad del proceso de determinación del factor de corrección para cada medida a partir de las tablas de Harkins y Jordan, en las soluciones acuosas se admite la utilización de un procedimiento simplificado de lectura de la tensión superficial tomando directamente los valores corregidos de la tabla siguiente, (se recurrirá a la interpolación en las lecturas que se sitúen entre dos valores de la tabla).

TABLA: CORRECCIÓN DE LOS VALORES MEDIDOS DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Válido solamente para las soluciones acuosas $\rho = 1$ g/cm³

R = 9,55 mm (radio medio del anillo)

r = 0,185 mm (radio del hilo que constituye el anillo)

Valor experimental (mN/m)	Valor corregido (mN/m)	
	Calibrado con contrapeso [véase el punto 1.6.4.2.2.(a)]	Calibrado con agua [véase el punto 1.6.4.2.2.(b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Esta tabla se ha elaborado a partir de la corrección de Harkins Jordan, y es similar a la de la norma DIN (DIN 53914) para agua y soluciones acuosas (densidad $\rho = 1$ g/cm³); se utiliza con un anillo existente en el mercado cuyas dimensiones son R = 9,55 mm (radio medio del anillo) y r = 0,185 mm (radio del hilo que constituye el anillo). La tabla da los valores corregidos de las medidas de tensión superficial efectuadas tras un calibrado con contrapesos o con agua.

Otra posibilidad, sin calibrado previo, consiste en calcular la tensión superficial por medio de la fórmula siguiente:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4 \pi R}$$

donde

F = fuerza medida en el dinamómetro en el punto de ruptura de la película

R = radio del anillo

f = factor de corrección (1).

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado;

— tipo de agua o de solución utilizada,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— resultados de las medidas: tensión superficial (leída) incluyendo a la vez las diferentes lecturas y su medida aritmética, así como el valor medio corregido (teniendo en cuenta el factor específico del equipo y la tabla de corrección),

— concentración de la solución,

— temperatura del ensayo,

— tiempo de la solución empleada; en particular, el tiempo transcurrido entre la preparación de la solución y su medida,

— evolución de la tensión superficial de la solución con el tiempo a partir del momento en que se haya transferido al recipiente de medida,

— deben señalarse todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, especialmente lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que el agua destilada tiene una tensión superficial de 72,75 mN/m a 20 °C, se considerarán sustancias tensioactivas aquellas que presenten una tensión superficial inferior a 60 mN/m en las condiciones de este método.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Interscience Publ., Nueva York, 1959, vol. I, Part I.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, Vol. 48, 511

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, Vol. 52, 1751.

A.6. HIDROSOLUBILIDAD

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. INTRODUCCIÓN

Antes de proceder al ensayo, es conveniente disponer de información sobre la fórmula desarrollada, la presión de vapor, la constante de disociación y la hidrólisis (como función del pH) de la sustancia.

No existe un solo método que cubra toda la gama de solubilidades en el agua.

Los dos métodos de ensayo descritos a continuación abarcan la gama completa de solubilidades pero no son aplicables a sustancias volátiles:

— el primero, denominado en lo sucesivo «método de elución en columna», se aplica a las sustancias esencialmente puras con escasa solubilidad ($< 10^{-2}$ g/l) y estables en el agua,

— el segundo, denominado en lo sucesivo «método del frasco», se aplica a las sustancias esencialmente puras de solubilidad mayor ($> 10^{-2}$ g/l) y estables en el agua.

La hidrosolubilidad de la sustancia puede verse considerablemente afectada por la presencia de impurezas.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La hidrosolubilidad de una sustancia es la concentración de saturación de masa de la sustancia en el agua a una temperatura determinada. Se expresa en unidades de masa por volumen de solución. La unidad SI es el kg/m³ (se puede utilizar tambien g/l).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se analice una sustancia nueva. Deben servir esencialmente para controlar de vez en cuando la validez del método y permitir la comparación con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La cantidad aproximada de muestra y el tiempo necesario para conseguir la concentración de saturación de masa, deben determinarse mediante un ensayo preliminar sencillo.

1.4.1. Método de elución en columna

Este método se basa en la elución con agua de la sustancia problema en una microcolumna cargada con un material soporte inerte como, por ejemplo, bolas de cristal o arena, cubierto con un exceso de sustancia problema. La hidrosolubilidad se determina cuando la concentración en masa del eluato es constante, lo que se indica con una meseta de la gráfica en función del tiempo.

1.4.2. Método de frasco

En este método, la sustancia (los sólidos deben estar pulverizados) se disuelve en agua a una temperatura algo superior a la temperatura de ensayo. Cuando se alcanza la saturación, se enfría la mezcla, se mantiene a la temperatura de ensayo y se agita hasta alcanzar el equilibrio. Otra posibilidad es realizar la medida directamente a la temperatura de ensayo si, mediante un muestreo adecuado, se garantiza que se ha alcanzado el equilibrio de saturación. Luego, se determina con un método analítico apropiado la concentración en masa de la sustancia en la solución acuosa, que no debe contener ninguna partícula sin disolver.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

1.5.1. **Repetibilidad**

En lo que respecta al método de elución en columna, se puede conseguir < 30 %; en cuanto al método del frasco, la repetibilidad deberá ser inferior al 15 %.

1.5.2. **Sensibilidad**

Depende del método de análisis, pero la concentración se puede determinar hasta 10^{-6} g/l.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Condiciones del ensayo**

El ensayo debe efectuarse, a ser posible, a 20 °C ± 0,5 °C. Si se teme que la temperatura repercuta en la solubilidad (> 3% por °C), se utilizarán también otras dos temperaturas, una superior y otra inferior al menos en 10 °C a la temperatura inicial elegida. En este caso, la temperatura debe ajustarse a ± 0,1 °C. La temperatura elegida se mantendrá constante en todas las partes importantes del equipo.

1.6.2. **Ensayo preliminar**

En una probeta de 10 ml con tapón de vidrio, que contenga alrededor de 0,1 g de muestra (las sustancias sólidas deben estar reducidas a polvo), añadir volúmenes crecientes de agua destilada a temperatura ambiente, siguiendo la progresión indicada en el cuadro siguiente:

0,1 g soluble en «x» ml de agua	0,1	0,5	1	2	10	100	>100
solubilidad aproximada (g/l)	>1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	< 1

Después de la adición de cada una de las cantidades de agua indicadas, agitar vigorosamente la mezcla durante diez minutos y luego comprobar visualmente si contiene partículas de muestra no disueltas. Si después de añadir 10 mm de agua, la muestra o determinadas partes de ésta no se han disuelto, hay que repetir el experimento en una probeta de 100 ml con mayores volúmenes de agua. Si la solubilidad es escasa, el tiempo necesario para disolver la sustancia puede ser considerablemente más largo (hay que dejar al menos 24 horas). La solubilidad aproximada se indica, en el cuadro, bajo el volumen de agua añadida en que se efectúa la disolución completa de la muestra. Si la sustancia se mantiene aparentemente insoluble, hay que dejar más de 24 horas (96 horas como máximo) o bien proceder a una nueva dilución a fin de determinar si hay que utilizar el método de elución en columna o el método de solubilidad en frasco.

1.6.3. **Método de elución en columna**

1.6.3.1. *Material soporte, disolvente y eluyente*

En el método de elución en columna, el material soporte debe ser inerte. Se pueden emplear bolas de cristal y arena. Para aplicar la sustancia problema al soporte, se utilizará un disolvente volátil adecuado de pureza de reactivo para análisis. Debe emplearse como eluyente agua bidestilada procedente de un aparato de vidrio o de cuarzo.

Nota:

No debe utilizarse agua procedente directamente de un intercambiador de iones orgánico.

1.6.3.2. *Carga del soporte*

Pesar unos 600 mg de material soporte y pasarlos a un matraz de fondo redondo de 50 ml.

Disolver una cantidad idónea y pesada de la sustancia problema en el disolvente elegido. Añadir al soporte una cantidad adecuada de esta solución. El disolvente debe evaporarse por completo, por ejemplo en un rotavapor; de lo contrario, no se daría la saturación en agua del soporte debido al efecto de partición en la superficie del soporte.

La carga del soporte puede plantear dificultades (resultados erróneos) si la sustancia problema se deposita en forma de aceite o en una fase cristalina diferente. La dificultad debe examinarse experimentalmente y recoger los datos correspondientes.

Dejar que se empape el soporte cargado de esta forma durante unas 2 horas en 5 ml de agua, aproximadamente, y luego pasar la suspensión a la microcolumna. También se podrá verter en esta última el soporte cargado seco, después de haber llenado previamente la microcolumna de agua y se equilibra después durante unas 2 horas.

Procedimiento:

La elución de la sustancia a partir del soporte puede efectuarse mediante dos sistemas diferentes:

— bomba de recirculación (véase la figura 1),

— recipiente de nivelación (véase la figura 4).

1.6.3.3. *Método de elución en columna con bomba de recirculación*

Aparato

En la figura 1 se muestra el esquema de un sistema que se utiliza normalmente. La figura 2 representa una microcolumna idónea, pero cualquier otra de dimensiones diferentes es aceptable, siempre que se mantengan los criterios de reproducibilidad y de sensibilidad. La columna debe tener un espacio de cabeza correspondiente al menos a 5 volúmenes de lecho de agua y una capacidad mínima de cinco muestras. No obstante, se puede reducir la dimensión si los cinco volúmenes de lecho iniciales, eliminados con las impurezas, se sustituyen por disolvente de relleno.

La columna debe estar unida a una bomba de recirculación que garantice un caudal aproximado de 25 ml/hora. Las conexiones de la bomba son de politetrafluoretileno (PTFE) o vidrio. La columna y la bomba, cuando estén unidas, deben permitir la toma de muestras del efluente y el equilibrado a presión atmosférica del espacio de cabeza. El material de la columna se retiene con un pequeño tapón de lana de vidrio (5 mm) que servirá también para separar las partículas por filtración. Como bomba de recirculación se podrá utilizar, por ejemplo, una bomba peristáltica o una bomba de membrana (hay que procurar que el material del tubo no sea causa de contaminación ni adsorción).

Procedimiento de medida

Se inicia la circulación a través de la columna. El caudal recomendado es de 25 ml/hora, aproximadamente (unos 10 volúmenes de lecho por hora para la columna arriba descrita). Los cinco primeros volúmenes de lecho (mínimo) se descartan a fin de eliminar las impurezas solubles en el agua. Luego se conecta la bomba de recirculación, haciendo funcionar el aparato hasta llegar al estado de equilibrio, definido por cinco muestras sucesivas cuyas concentraciones no difieran de forma aleatoria en más de ± 30 %. Dichas muestras deben estar separadas entre sí por un intervalo de tiempo correspondiente al paso de al menos 10 volúmenes de lecho del eluyente.

1.6.3.4. *Método de elución en columna con recipiente de nivelación*

Aparato (véanse las figuras 3 y 4)

Recipiente de nivelación: la conexión con este recipiente se hace mediante una junta de vidrio esmerilado, unida por tubos de politetrafluoretileno. El caudal recomendado es de unos 25 ml/hora. Se recogerán las sucesivas fracciones de eluato y se analizarán según el método elegido.

Procedimiento de medida:

Para determinar la hidrosolubilidad se utilizarán las fracciones procedentes del intervalo medio de elución cuyas concentraciones sean constantes (± 30 %) al menos en cinco fracciones consecutivas.

En ambos casos (con bomba de recirculación o con recipiente de nivelación) se repetirá la operación, reduciendo el caudal a la mitad. Si los resultados de las dos operaciones concuerdan, la prueba es satisfactoria; si se observa una solubilidad aparente más elevada con el caudal inferior, se continuará con la reducción del caudal a la mitad hasta que se obtenga la misma solubilidad en dos operaciones sucesivas.

En los dos casos (bomba de recirculación o recipiente de nivelación), se debe controlar la posible presencia de materia coloidal en las fracciones estudiando la aparición del efecto Tyndall (dispersión de la luz). La presencia de tales partículas falsea los resultados y el ensayo deberá repetirse mejorando la eficacia de la filtración de la columna.

Anotar el pH de cada muestra. Efectuar una segunda operación a la misma temperatura.

1.6.4. **Método de frasco**

1.6.4.1. *Aparatos*

Para este método se requiere el material siguiente:

— material de vidrio e instrumentos de laboratorio normales,

— dispositivo adecuado para agitar las disoluciones a temperaturas constantes controladas,

— centrífuga preferiblemente termostatizada y, si fuere necesario, con emulsiones,

— equipo para la determinación analítica.

1.6.4.2. *Procedimiento de medida*

Evaluar, a partir del ensayo preliminar, la cantidad de producto necesario para saturar el volumen de agua elegido. El volumen de agua necesario dependerá del método analítico y del intervalo de solubilidad. Poner una cantidad de material aproximadamente cinco veces superior a la cantidad determinada antes, en cada uno de tres recipientes de vidrio con tapón, también de vidrio (por ejemplo, tubos de centrífuga, matraces). Añadir a cada recipiente el volumen de agua elegido y taparlo herméticamente. Agitar los recipientes, debidamente cerrados, a 30 °C (utilizar un dispositivo agitador o mezclador que pueda actuar a temperatura constante como, por ejemplo, un agitador magnético en baño de agua controlado por termostato). Un día después, retirar uno de los recipientes y volver a equilibrar durante 24 horas a la temperatura del ensayo, agitando de vez en cuando. El contenido del recipiente se centrifuga luego a la temperatura del ensayo y se determina la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa clara utilizando un método analítico adecuado. Los otros dos matraces se tratan de la misma manera, después de un primer equilibrado a 30 °C durante dos y tres días, respectivamente. Si al menos las concentraciones de los dos últimos recipientes concuerdan con la reproducibilidad requerida, el ensayo es satisfactorio. Si los resultados de los recipientes 1, 2 y 3 acusan una tendencia a la progresión, repetir de nuevo todo el ensayo utilizando tiempos de equilibrado más largos.

El procedimiento de medida puede realizarse también sin la preincubación a 30 °C. Para evaluar la velocidad de adquisición del equilibrio de saturación se irán tomando muestras hasta que el tiempo de agitación deje de influir en la concentración de la solución problema.

Debe anotarse el pH de cada muestra.

1.6.5. **Análisis**

Para efectuar estas determinaciones es preferible utilizar un método de análisis que sea específico de la sustancia, pues pequeñas cantidades de impurezas solubles pueden originar errores sensibles en la solubilidad medida. Pueden citarse como ejemplos los siguientes métodos: cromatografía en fase gaseosa o líquida, métodos volumétricos, métodos fotométricos, métodos voltamétricos.

2. **RESULTADOS**

2.1. MÉTODO DE ELUCIÓN EN COLUMNA

En cada operación debe calcularse el valor medio de al menos cinco muestras consecutivas tomadas durante el equilibrio de saturación, así como la desviación típica. Los resultados deben expresarse en unidades de masa por volumen de solución.

Las medias calculadas en dos pruebas con diferentes caudales se compararán para comprobar que su repetibilidad es inferior al 30 %.

2.2. MÉTODO DE FRASCO

Deben indicarse los resultados individuales de cada uno de los tres frascos; se hará la media de los resultados considerados constantes (repetibilidad inferior al 15 %) y se expresarán en unidades de masa por volumen de solución. Dicha operación podrá requerir la conversión de las unidades de masa en unidades de volumen, utilizando la densidad cuando la solubilidad sea muy elevada (> 100 g/l).

3. **INFORME**

3.1. MÉTODO DE ELUCIÓN EN COLUMNA

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— resultados del ensayo preliminar,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— concentraciones individuales, caudales y pH de cada muestra,

— desviación típica y media de al menos cinco muestras tomadas durante el equilibrio de saturación de cada operación,

— media de dos operaciones consecutivas aceptables,

— temperatura del agua durante el proceso de saturación,

— método de análisis utilizado,

— naturaleza del material de soporte,

— carga del material de soporte,

— disolvente utilizado,

— cualquier indicación de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo y método utilizado,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, especialmente lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

3.2. MÉTODO DE FRASCO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— resultados del ensayo preliminar,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— resultados analíticos individuales y su media cuando se determine más de un valor para un mismo recipiente,

— pH de cada muestra,

— media de los valores de los diferentes recipientes cuando concuerden,

— temperatura del ensayo,

— método analítico utilizado,

— cualquier indicación de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo y método utilizado,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, especialmente lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method

Apéndice

Figura 1

Método de elución en columna con bomba de recirculación

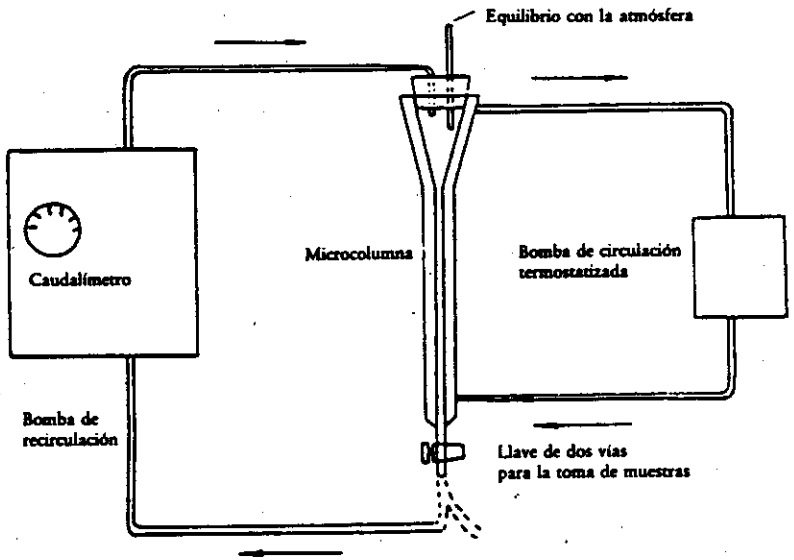


Figura 2

Microcolumna tipo
(dimensiones en milímetros)

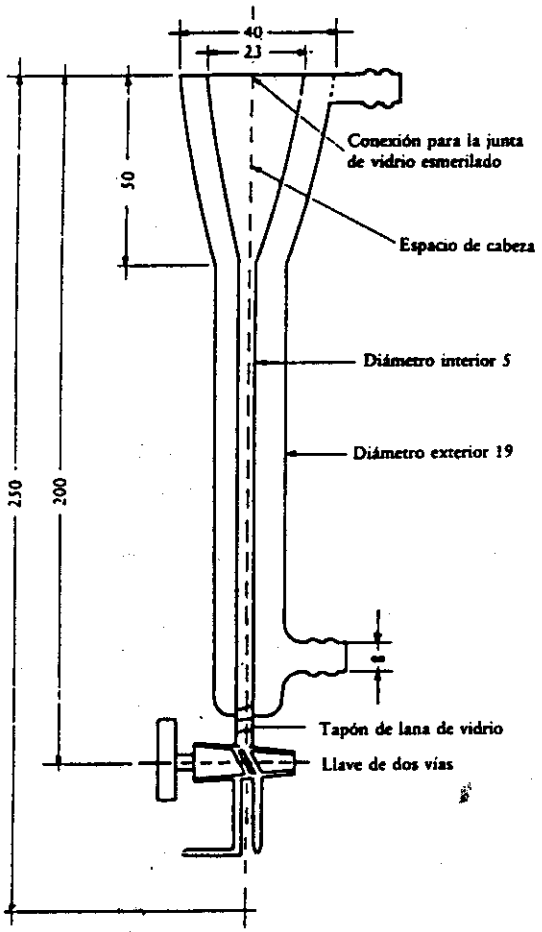
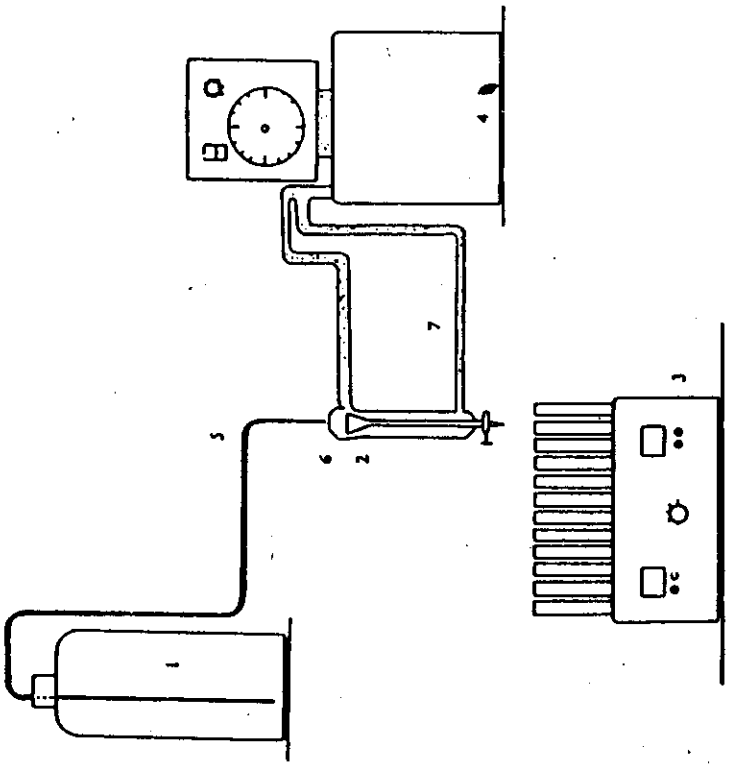


Figura 4

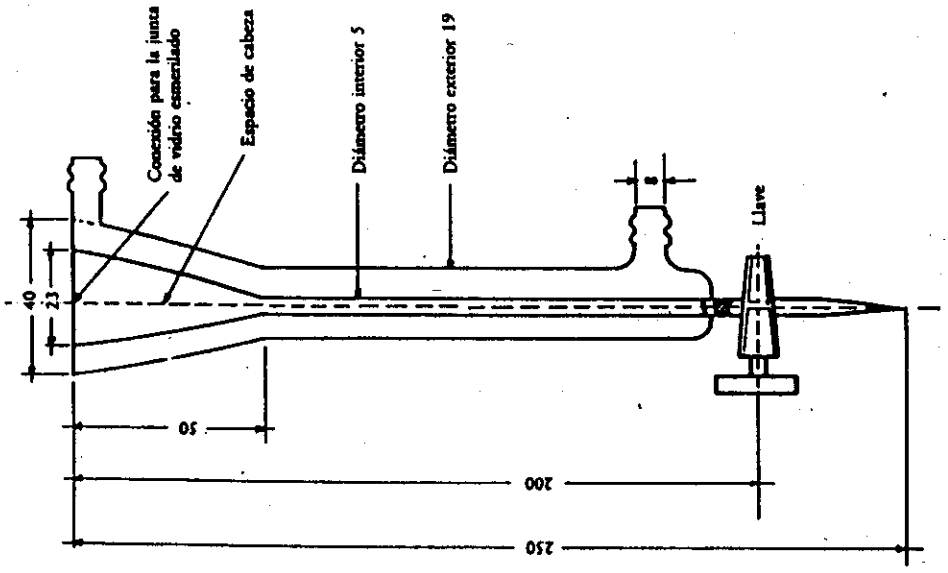
Método de elución en columna con recipiente de nivelación



1 = Recipiente de nivelación (por ejemplo, frasco de 2,5 l de capacidad)
2 = Columna (véase la figura 3)
3 = Colector de fracciones
4 = Termostato
5 = Tubo de teflón
6 = Tapón de vidrio esmerilado
7 = Tubo para la circulación de agua entre el termostato y la columna, con un diámetro interior de aproximadamente 8 mm

Figura 3

Microcolumna tipo
(dimensiones en milímetros)



A.8 COEFICIENTE DE REPARTO

1. MÉTODO

El método de frasco de agitación se basa en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de información preliminar sobre la fórmula desarrollada, la constante de disociación, la hidrosolubilidad, la hidrólisis, la solubilidad en n-octanol y la tensión superficial de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Las medidas relativas a sustancias ionizables deben hacerse sólo con la forma no ionizada (ácido libre o base libre) obtenida mediante el uso de una solución amortiguadora con un pH que esté al menos una unidad de pH por debajo (ácido libre) o por encima (base libre) del pK.

Este método de ensayo incluye dos procedimientos distintos: el método de frasco de agitación y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El primero puede aplicarse cuando el valor de log P_{ow} (véanse más abajo las definiciones) está en el intervalo de −2 a 4, y el segundo cuando está en el intervalo de 0 a 6. Antes de llevar a cabo ninguno de los procedimientos experimentales es necesario obtener una estimación previa del coeficiente de reparto.

El método de frasco de agitación es aplicable sólo a sustancias esencialmente puras solubles en agua y n-octanol, y no es aplicable a productos tensoactivos (para los que debe darse su valor calculado o una estimación basada en las solubilidades en n-octanol y agua por separado).

El método de CLAR no puede aplicarse a ácidos o bases fuertes, complejos metálicos, materiales tensoactivos ni sustancias que reaccionen con el eluyente. Para estos materiales debe darse un valor calculado o una estimación basada en las solubilidades en n-octanol y agua por separado.

El método de CLAR es menos sensible a la presencia de impurezas en el compuesto problema que el método de frasco de agitación. Sin embargo, las impurezas pueden hacer en algunos casos que la interpretación de los resultados sea difícil porque la atribución de los picos resulte dudosa. En el caso de mezclas que den una banda sin resolución, hay que establecer los límites superior e inferior de log P.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El coeficiente de reparto (P) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio (c_i) de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles. En el caso del n-octanol y del agua:

$$P_{ow} = \frac{c_{n\text{-octanol}}}{c_{agua}}$$

El coeficiente de reparto (P) es, pues, el cociente de dos concentraciones: se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal (log P).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Método de frasco de agitación

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se investiga una nueva sustancia. Deben servir esencialmente para comprobar de vez en cuando la eficacia del método y para comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

Método de CLAR

Con el fin de relacionar los datos medidos según la CLAR de un compuesto con su P, hay que trazar una gráfica de calibración (log P - datos cromatográficos) con al menos 6 puntos de referencia. La selección de las sustancias de referencia adecuadas depende del criterio del analista. Siempre que sea posible, al menos una sustancia de referencia debe tener un P_{ow} superior al de la sustancia problema, y otra un P_{ow} inferior al de la sustancia problema. En el caso de valores de log P inferiores a 4, la calibración puede basarse en datos obtenidos por el método de frasco de agitación. En el caso de valores de log P superiores a 4, la calibración puede basarse en valores validados aparecidos en la bibliografía, siempre que estos valores estén de acuerdo con los valores calculados. Para mayor precisión, es preferible elegir compuestos de referencia que estén relacionados estructuralmente con la sustancia problema.

Se dispone de amplias listas de valores de log P_{ow} de muchos grupos de productos químicos (2) (3). Si no se tienen datos sobre los coeficientes de reparto de compuestos relacionados estructuralmente, puede utilizarse entonces una calibración más general, establecida con otros compuestos de referencia.

En el apéndice 2 se recoge una relación de sustancias de referencia recomendadas con sus valores de P_{ow}.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

1.4.1. Método de frasco de agitación

Para determinar un coeficiente de reparto, es necesario conseguir un equilibrio entre los elementos constitutivos del sistema que se influencien mutuamente y determinar las concentraciones de las sustancias disueltas en las dos fases. Examinando la bibliografía existente sobre este tema, se encuentra que pueden utilizarse varias técnicas diferentes para resolver este problema, es decir, la mezcla completa de las dos fases, seguida de su separación, que permita determinar la concentración en equilibrio de la sustancia de ensayo.

1.4.2. Método de CLAR

La CLAR se realiza en columnas analíticas rellenas de una fase sólida comercializada con cadenas hidrocarbonadas largas (C_8, C_{18}, por ejemplo) unidas por enlaces químicos a la sílice. Los productos químicos inyectados en esta columna la recorrerán a diferente velocidad debido a los diferentes grados de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria hidrocarbonada. Las mezclas de productos químicos se eluyen por orden de hidrofobicidad, saliendo antes los productos hidrosolubles y después los liposolubles, según su coeficiente de reparato hidrocarburo-agua. Esto permite establecer una relación entre el tiempo de retención en una columna de este tipo (de fase inversa) y el coeficiente de reparto n-octanol/agua. El coeficiente de reparto se deduce del factor de capacidad k, dado por la expresión

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

donde t_R = tiempo de retención de la sustancia problema y t_0 = tiempo medio que necesita una molécula de disolvente para recorrer la columna (tiempo muerto).

No es necesario utilizar métodos analíticos cuantitativos, sino sólo determinar los tiempos de elución.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

1.5.1. Repetibilidad

Método de frasco de agitación

Para obtener un coeficiente de reparto preciso, se harán determinaciones por duplicado en tres series de condiciones de ensayo diferentes, pudiendo variar tanto la cantidad de sustancia especificada como la relación de volumen de los disolventes. Los logaritmos de los valores determinados del coeficiente de reparto deberán situarse en un intervalo de ± 0,3 unidades logarítmicas.

Método de CLAR

Para aumentar la confianza de la medida, deben hacerse las determinaciones por duplicado. Los valores de log P procedentes de las distintas medidas deben estar dentro de un intervalo de ± 0,1 unidades logarítmicas.

1.5.2. **Sensibilidad**

Método de frasco de agitación

El intervalo de medida del método está determinado por el límite de detección del procedimiento analítico. Esto debe ser suficiente para evaluar los valores de log P_{ow} en el intervalo de −2 a 4 (a veces, bajo ciertas condiciones, este intervalo puede ampliarse hasta un log P_{ow} de 5), cuando la concentración del soluto en cada fase no sobrepase los 0,01 moles por litro.

Método de CLAR

El método de CLAR permite la evaluación de coeficientes de reparto en el intervalo de log P_{ow} entre 0 y 6.

En principio, el coeficiente de reparto de un compuesto puede estimarse en el margen de ± 1 unidad logarítmica del valor obtenido con el frasco de agitación. En la bibliografía se encuentran correlaciones típicas (4)(5)(6)(7)(8). Normalmente puede obtenerse mayor precisión cuando los gráficos de correlación se basan en compuestos de referencia relacionados estructuralmente (9).

1.5.3. **Especificidad**

Método de frasco de agitación

La ley de reparto de Nernst sólo se aplica a temperatura, presión y pH constantes para las soluciones diluidas. Estrictamente se aplica a una sustancia pura dispersada entre dos disolventes puros. Los resultados pueden ser modificados por la aparición simultánea, en una o ambas fases, de varios solutos diferentes.

La disociación o la asociación de las moléculas disueltas se traduce en desviaciones respecto a la ley de reparto citada. Estas desviaciones se observan porque el coeficiente de reparto pasa a depender entonces de la concentración de la solución.

Debido a los multiples equilibrios implicados, este método de ensayo no debe aplicarse sin corregir a los compuestos ionizables. Para estos compuestos debe considerarse la utilización de soluciones amortiguadoras en lugar de agua; el pH de la solución amortiguadora debe diferir del pKa de la sustancia al menos en una unidad de pH y hay que tener en cuenta la importancia de este pH para el medio ambiente.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Estimación preliminar del coeficiente de reparto**

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse preferentemente mediante un método de cálculo (véase el apéndice 1), o bien, cuando sea adecuado, utilizando la relación de las solubilidades de la sustancia de ensayo en los disolventes puros (10).

1.6.2. **Método de frasco de agitación**

1.6.2.1. *Preparación*

n-Octanol: la determinación del coeficiente de reparto debe hacerse recurriendo a un reactivo de calidad analítica.

Agua: utilizar agua destilada o bidestilada procedente de un aparato de cristal o de cuarzo. En el caso de compuestos ionizables, puede ser necesario utilizar soluciones amortiguadoras en lugar de agua.

Nota:

Evitar el agua extraída directamente de un intercambiador de iones.

1.6.2.1.1. Presaturacion de los disolventes

Antes de determinar un coeficiente de reparto, se saturan recíprocamente las fases del sistema de disolventes agitándolas a la temperatura de ensayo. Para realizar esto, es preciso agitar durante 24 horas, en un agitador mecánico, dos grandes frascos que contengan n-octanol puro de calidad analítica o agua, con una cantidad suficiente del otro disolvente y dejarlos reposar hasta que se separen las fases y se alcance el estado de saturación.

1.6.2.1.2. Preparación para el ensayo

El volumen del sistema bifásico debe llenar casi completamente el recipiente de ensayo para evitar cualquier pérdida de materia debida a la volatilización. La relación de volumen y las cantidades de sustancia que deben utilizarse se determinan de la siguiente manera:

— estimación preliminar del coeficiente de reparto (véase más arriba),

— cantidad mínima de sustancia de ensayo requerida para el procedimiento analítico utilizado,

— límite de concentración máxima en cada fase de 0,01 moles por litro.

Se efectúan tres ensayos. En el primero se utiliza la relación calculada de volúmenes de n-octanol y agua, en el segundo se divide por dos esta relación, y en el tercero se multiplica por dos esta relación (p. ej., 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Sustancia de ensayo

Se prepara una solución de reserva en n-octanol presaturado con agua. La concentración de esta solución de reserva debe determinarse con precisión antes de utilizarla para determinar el coeficiente de reparto. Esta solución deberá guardarse en condiciones que garanticen su estabilidad.

1.6.2.2. *Condiciones de ensayo*

La temperatura de ensayo debe mantenerse constante (± 1° C) y situarse en el intervalo de 20 °C a 25 °C.

1.6.2.3. *Procedimiento de medida*

1.6.2.3.1. Establecimiento del equilibrio de reparto

Para cada serie de condiciones de ensayo, preparar recipientes de ensayo por duplicado con las cantidades requeridas, cuidadosamente medidas, de los dos disolventes, así como la cantidad necesaria de solución de reserva.

Medir los volúmenes de las fases de n-octanol. Colocar en un agitador apropiado o agitar a mano los recipientes de ensayo. En caso de usar un tubo para centrifugar, un método que se recomienda consiste en hacer girar rápidamente 180 grados alrededor de su eje transversal el tubo, de forma que el aire que pudiera haber quedado retenido atraviese las dos fases. La experiencia muestra que 50 giros de este tipo suelen ser suficientes para establecer el equilibrio de reparto. Para mayor seguridad, se recomienda hacer 100 giros en cinco minutos.

1.6.2.3.2. Separación de las fases

Cuando sea necesario para separar las fases, centrifugar la mezcla. Efectuar esta operación con una centrifuga de laboratorio mantenida a temperatura ambiente o, si se utiliza una centrifuga sin control de temperatura, equilibrar los tubos de centrifuga a la temperatura de ensayo durante por lo menos una hora antes del análisis.

1.6.2.4. *Análisis*

Para determinar el coeficiente de reparto, es necesario analizar las concentraciones de la sustancia de ensayo en las dos fases. Para ello, se puede extraer una alícuota de cada una de las dos fases de cada tubo, para cada serie de condiciones de ensayo, y analizarlas según el procedimiento elegido. Debe calcularse la cantidad total de sustancia presente en las dos fases y compararla con la cantidad introducida inicialmente.

La muestra de la fase acuosa debe tomarse por un procedimiento que reduzca al mínimo el riesgo de incorporar trazas de n- octanol: para ello se puede utilizar una jeringuilla de cristal con aguja intercambiable; en primer lugar hay que llenar parcialmente de aire la jeringuilla y a continuación expulsarlo lentamente mientras que se va introduciendo al mismo tiempo la aguja a través de la capa de n-octanol. Extraer un volumen adecuado de fase acuosa. Retirar rápidamente la jeringuilla de la solución y quitar la aguja. El contenido de la jeringuilla se podrá utilizar entonces como muestra acuosa. La concentración en las dos fases diferentes deberá determinarse, preferentemente, mediante un procedimiento específico de la sustancia. Algunos ejemplos de métodos analíticos que pueden ser adecuados son:

— métodos fotométricos,

— cromatografía en fase gaseosa,

— cromatografía líquida de alta resolución.

1.6.3. Método de CLAR

1.6.3.1. *Preparación*

Aparatos

Se necesita un cromatógrafo de líquidos, dotado de una bomba de caudal constante y un instrumento de detección adecuado. Es recomendable el uso de una válvula de inyección con circuito de inyección. La presencia de grupos polares en la fase estacionaria puede afectar gravemente al funcionamiento de la columna de CLAR; por tanto, las fases estacionarias deben presentar la mínima proporción posible de grupos polares (11). Pueden utilizarse rellenos de fase inversa con micropartículas o columnas ya rellenas, disponibles comercialmente. Puede ponerse una columna de seguridad entre el sistema de inyección y la columna de análisis.

Fase móvil

Para preparar el disolvente de elución, del que se eliminarán los gases disueltos antes de utilizarlo, se empleará metanol para CLAR y agua para CLAR. Se empleará la elución isocrática. Se utilizarán mezclas de metanol/agua en que el contenido mínimo de agua será del 25%. La mezcla típica de metanol-agua en la proporción de 3:1 (v/v) es satisfactoria para eluir compuestos de log P 6 en el plazo de una hora con un caudal de 1 ml/min. En el caso de compuestos de mayor log P puede ser necesario abreviar el tiempo de elución (y el de los compuestos de referencia) disminuyendo la polaridad de la fase móvil o la longitud de la columna.

Las sustancias muy poco solubles en n-octanol tienden a dar valores de log P_{ow} anormalmente bajos con el método de CLAR; los picos de estos compuestos acompañan a veces al frente de disolvente. Esto se debe probablemente al hecho de que el proceso de reparto es demasiado lento como para alcanzar el equilibrio en el tiempo necesario normalmente en una separación por CLAR. Si se disminuye el caudal y/o se baja la proporción metanol/agua es posible obtener un valor fiable.

Las sustancias de ensayo y de referencia deben ser solubles en la fase móvil en concentraciones suficientes para permitir su detección. Sólo podrán añadirse aditivos a la mezcla metanol-agua en casos excepcionales, ya que los aditivos cambian las propiedades de la columna. Si se trata de cromatogramas con aditivos, es obligatorio utilizar una columna independiente del mismo tipo. Si la mezcla metanol-agua no es adecuada, pueden utilizarse otras mezclas de disolventes orgánicos con agua, como etanol-agua o acetonitrilo-agua.

El pH del eluyente es fundamental para los compuestos ionizables. Debe situarse en el intervalo de pH de funcionamiento de la columna, que suele estar entre 2 y 8. Se recomienda el uso de soluciones amortiguadoras. Hay que evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna que se producen con algunas mezclas de fase orgánica con soluciones amortiguadoras. Las medidas de CLAR con fases estacionarias a base de sílice con el pH superior a 8 no son recomendables porque el uso de una fase móvil alcalina puede provocar una rápida alteración de las características de la columna.

Solutos

Los compuestos de referencia deben tener la mayor pureza posible. Si es posible, los compuestos que se vayan a utilizar en el ensayo o en la calibración se disolverán en la fase móvil.

Condiciones de ensayo

La temperatura durante las medidas no debe variar más de ± 2 K.

1.6.3.2. *Medida*

Cálculo del tiempo muerto t_0

El tiempo muerto t_0 puede determinarse utilizando una serie homóloga (por ejemplo, n-alquil-metil-cetonas) o bien compuestos orgánicos no retenidos (por ejemplo, tiourea o formamida). Para calcular el tiempo muerto t_0 utilizando una serie homóloga, se inyectarán al menos 7 miembros de una serie homóloga y se determinarán sus respectivos tiempos de retención. Los tiempos de retención, medidos directamente, $t_{r(n_c+1)}$, se representan gráficamente en función de $t_{r(n_c)}$ y se determinan la ordenada en el origen a y la pendiente b de la ecuación de regresión:

$$t_{r(n_c+1)} = a + b\, t_{r(n_c)}$$

siendo n_c = número de átomos de carbono. El tiempo muerto t_0 viene dado por:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

Gráfico de calibración

El paso siguiente es construir una gráfica de correlación de log k frente a log P para los compuestos de referencia adecuados. En la práctica, se inyecta simultáneamente una serie de 5 a 10 compuestos patrón de referencia cuyo log P esté alrededor del intervalo supuesto, y se determinan los tiempos de retención, preferiblemente con un integrador-registrador unido al sistema de detección. Se calculan los respectivos logaritmos de los factores de capacidad, log K, y se representan en función del log P determinado según el método de frasco de agitación. La calibración se realiza a intervalos regulares, al menos una vez al día, de forma que puedan tenerse en cuenta los posibles cambios en las características de la columna.

Determinación del factor de capacidad de la sustancia de ensayo

Se inyecta la cantidad más pequeña posible de sustancia de ensayo en fase móvil. Se determina (por duplicado) el tiempo de retención para calcular el factor de capacidad k. A partir de la gráfica de correlación de los compuestos de referencia puede interpolarse el coeficiente de reparto de la sustancia de ensayo. Cuando los coeficientes de reparto son muy altos o muy bajos es necesario hacer una extrapolación y en estos casos hay que tener muy en cuenta los límites de confianza de la línea de regresión.

2. RESULTADOS

Método de frasco de agitación

La fiabilidad de los valores determinados de P puede verificarse procediendo a una comparación de las medias de las determinaciones efectuadas por duplicado frente a la media general.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— cuando no puedan aplicarse los métodos (p. ej., con productos tensoactivos), habrá que dar un valor calculado o una estimación a partir de las solubilidades en n-octanol y agua por separado,

— toda la información y las observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, especialmente en lo relativo a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

Para el método de frasco de agitación:

— resultado de la estimación previa, en su caso,

— temperatura de la determinación,

— datos sobre los procedimientos analíticos utilizados para determinar las concentraciones,

— tiempo y velocidad de la centrifugación, en su caso,

— concentraciones medidas en ambas fases en cada determinación (es decir, hay que indicar un total de 12 concentraciones),

— peso de la sustancia de ensayo, volumen de cada fase empleado en cada recipiente de ensayo y cantidad calculada total de sustancia de ensayo presente en cada fase tras el equilibrado,

— valores calculados del coeficiente de reparto (P) y media de cada conjunto de condiciones de ensayo, así como la media de todas las determinaciones. Si hay alguna indicación de que el coeficiente de reparto puede variar con la concentración, habrá que señalarlo en el informe,

— desviación típica de los distintos valores de P respecto a su media,

— media del valor P de todas las determinaciones, expresada también en logaritmo decimal,

— valor teórico calculado de P_{ow} cuando este valor se haya determinado o cuando el valor medido sea superior a 10^4,

— pH del agua utilizada y fase acuosa durante la prueba,

— si se utilizan soluciones amortiguadoras, hay que justificar su uso en lugar del agua e indicar su composición, concentración y pH, así como el pH de la fase acuosa antes y después del ensayo.

Para el método de CLAR:

— resultado de la estimación previa, en su caso,

— sustancias de ensayo y de referencia, con sus purezas,

— intervalo de temperatura de las determinaciones,

— pH al que se hacen las determinaciones,

— características de las columnas de análisis y de seguridad, fase móvil y sistema de detección,

— datos de la retención y valores de log P de la bibliografía correspondiente a las sustancias de referencia utilizadas en la calibración,

— datos de la recta de regresión ajustada (log K frente a log P),

— datos de retención media y valor interpolado de log P del compuesto problema,

— descripción del equipo y condiciones de funcionamiento,

— perfiles de elución,

— cantidades de sustancias problema y de referencia introducidas en la columna,

— tiempo muerto y método para medirlo.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch y A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström y K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1981, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt y R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky y A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa y E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (editado por E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band 1/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker y H.M. de Kort, Euro. J Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, Vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth y P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani y E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson y G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D.S. Brown y E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel y K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, Nueva York, 1979.

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

Apéndice 1

Métodos de cálculo y estimación

INTRODUCCIÓN

En *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a) se ofrece una introducción general de los métodos de cálculo, junto con datos y ejemplos.

Los valores calculados de P_{ow} pueden utilizarse:

— para decidir cuál de los métodos experimentales es adecuado (intervalo del método de frasco de agitación: log P_{ow} entre −2 y 4; intervalo del método de CLAR: log P_{ow} entre 0 y 6),

— para seleccionar las condiciones de ensayo adecuadas (p. ej., sustancias de referencia para procedimientos de CLAR, relación de volúmenes n-octanol/agua para el método de frasco de agitación),

— como control interno del laboratorio para detectar posibles errores experimentales,

— para dar una estimación de P_{ow} en casos en que los métodos experimentales no puedan aplicarse por causas técnicas.

MÉTODO DE ESTIMACIÓN

Estimación previa del coeficiente de reparto

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse a partir de las solubilidades de la sustancia problema en los disolventes puros:

$$P_{estimado} = \frac{c_{n\text{-octanol de saturación}}}{c_{agua\ de\ saturación}}$$

MÉTODOS DE CÁLCULO

Principio de los métodos de cálculo

Todos los métodos de cálculo se basan en la fragmentación formal de la molécula en subestructuras adecuadas de las que se conocen incrementos fiables de log P_{ow}. El log P_{ow} de toda la molécula se calcula entonces como la suma de los valores de los fragmentos correspondientes más unos términos de corrección por las interacciones intramoleculares.

Existen listas de constantes de fragmentos y términos de corrección (b) (c) (d) (e). Algunas se actualizan periódicamente (b).

Criterios cualitativos

En general, la fiabilidad del método de cálculo va disminuyendo al aumentar la complejidad del compuesto estudiado. En el caso de moléculas simples de bajo peso molecular y uno o dos grupos funcionales, puede esperarse una desviación de 0,1 a 0,3 unidades logarítmicas de P_{ow} entre los resultados de los diferentes métodos de fragmentación y el valor medido. Si se trata de moléculas más complejas, el margen de error puede ser mayor, dependiendo de la fiabilidad y disponibilidad de constantes de fragmentos, así como de la capacidad de detectar interacciones intramoleculares (p. ej., enlaces de hidrógeno) y del uso adecuado de los términos de corrección (problema menos arduo con los programas de ordenador CLOGP-3) (b). En el caso de compuestos ionizados, es importante considerar correctamente la carga o el grado de ionización.

Procedimientos de cálculo

Método de π de Hansch

La constante del sustituyente hidrofóbico original, π, introducida por Fujita et al. (f) se define como:

$$\pi_x = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

donde P_{ow} (PhX) es el coeficiente de reparto de un derivado aromático y P_{ow} (PhH) el del compuesto original.

$$(\text{P. ej. } \pi_{Cl} = \log P_{ow}\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71).$$

Según esta definición, el método de π es aplicable principalmente a la sustitución aromática. Se han tabulado los valores de π de gran número de sustituyentes (b) (c) (d) y se utilizan para calcular el log P_{ow} de moléculas o subestructuras aromáticas.

Método de Rekker

Según Rekker (g), el valor de log P_{ow} se calcula de la manera siguiente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{términos de interacción})$$

donde f_i representa las constantes de los diferentes fragmentos moleculares y a_i la frecuencia de su aparición en la molécula estudiada. Los términos de corrección pueden expresarse como integral múltiple de una sola constante C_m (llamada «constante mágica»). Las constantes de fragmentos f_i y C_m se han obtenido a partir de una lista de 1 054 valores experimentales de P_{ow} (825 compuestos) mediante análisis de regresión múltiple (c) (h). La determinación de los términos de interacción se lleva a cabo según normas establecidas recogidas en la bibliografía (e) (h) (i).

Método de Hansch-Leo

Según Hansch y Leo (c), el valor de log P_{ow} se calcula de la forma siguiente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

donde f_i representa las constantes de los diferentes fragmentos moleculares; F_j, los términos de corrección, y a_i y b_j las frecuencias correspondientes de presencia. A partir de valores experimentales de P_{ow}, se establecieron por el método de tanteo una lista de valores de fragmentos atómicos y de grupos y una lista de términos de corrección F_j (llamados «factores»). Los términos de corrección se han ordenado en varias clases diferentes (a) (c). Es bastante complicado y exige mucho tiempo el tener en cuenta todas las normas y los términos de corrección. Se han ideado programas informáticos (b).

Método combinado

El cálculo de log P_{ow} de moléculas complejas puede mejorarse considerablemente si se divide la molécula en grandes subestructuras de las que se conozcan valores fiables de log P_{ow} a partir de listas (b) (c) o por mediciones propias. Estos fragmentos (p.ej., heterociclos, antraquinona, azobenceno) pueden combinarse con los valores π de Hansch o con las constantes de fragmentos de Rekker o Leo.

Observaciones

i) Los métodos de cálculo sólo pueden aplicarse a compuestos parcial o completamente ionizados, si es posible tener en cuenta los necesarios factores de corrección.

ii) Si puede suponerse la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares, hay que añadir los correspondientes términos de corrección (aproximadamente, de + 0,6 a + 1,0 unidades logarítmicas de P_{ow}) (a). La presencia de tales enlaces puede suponerse a partir de modelos estéricos o datos espectroscópicos de la molécula.

iii) Si son posibles varias formas tautoméricas, debe usarse como base para el cálculo la forma más probable.

iv) Hay que seguir cuidadosamente las revisiones de las listas de constantes de fragmentos.

Informe

Cuando se utilicen métodos de cálculo/estimación, el informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— descripción de la sustancia (mezcla, impurezas, etc.),

— indicación de cualquier posible enlace de hidrógeno intramolecular, disociación, carga o cualquier otro efecto poco común (p. ej., tautomería),

— descripción del método de cálculo,

— indicación o suministro de la base de datos,

— peculiaridades de la selección de los fragmentos,

— documentación exhaustiva de los cálculos.

BIBLIOGRAFÍA

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl y D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Nueva York, 1983.

(b) Pomona College, Medical Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa y C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, vol. 1 Elsevier, Nueva York, 1977.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington D. C., 1984, Symposium Series 255, p.225.

Apéndice 2

Sustancias de referencia recomendadas para el método de CLAR

Nº	Sustancia de referencia	log P_{ow}	pKa
1	2-Butanona	0,3	
2	4-Acetilpiridina	0,5	
3	Anilina	0,9	
4	Acetanilida	1,0	
5	Alcohol bencílico	1,1	
6	p-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	BAcido fenoxiacético	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitrilo	1,6	
11	Fenilacetonitrilo	1,6	
12	Alcohol 4-metilbencílico	1,6	
13	Acetofenona	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	Ácido 3-nitrobenzoico	1,8	pKa = 3,47
16	4-Cloranilina	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenceno	1,9	
18	Alcohol cinámico	1,9	
19	Ácido benzoico	1,9	pKa = 4,19
20	p-Cresol	1,9	pKa = 10,17
21	Ácido cinámico	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisol	2,1	
23	Metilbenzoato	2,1	
24	Benceno	2,1	
25	Ácido 3-metilbenzoico	2,4	pKa = 4,27
26	4-Clorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Tricloroetileno	2,4	
28	Atrazina	2,6	
29	Etilbenzoato	2,6	
30	2,6-Diclorobenzonitrilo	2,6	
31	Ácido 3-clorobenzoico	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueno	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dicloroanilina	2,8	
35	Clorobenceno	2,8	
36	Alil-feniléter	2,9	
37	Bromobenceno	3,0	
38	Etilbenceno	3,2	
39	Benzofenona	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diclorobenceno	3,4	
43	Difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleno	3,6	
45	Fenilbenzoato	3,6	
46	Isopropilbenceno	3,7	
47	2,4,6-Triclorofenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenilo	4,0	
49	Bencilbenzoato	4,0	
50	2,4-Dinitro-6 sec. butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triclorobenceno	4,2	
52	Ácido dodecanoico	4,2	
53	Difeniléter	4,2	
54	n-Butilbenceno	4,5	
55	Fenantreno	4,5	
56	Fluoranteno	4,7	
57	Dibencilo	4,8	
58	2,6-Difenilpiridina	4,9	
59	Trifenilamina	5,7	
60	DDT	6,2	

Otras sustancias de referencia de bajo log P_{ow}

1	Ácido nicotínico	−0,07	

A.9. PUNTO DE INFLAMACIÓN

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos preliminares sobre la inflamabilidad de la sustancia antes de proceder al ensayo. Este procedimiento es aplicable a las sustancias líquidas cuyos vapores pueden ser inflamados por fuentes de ignición. Los métodos de ensayo descritos en el presente documento sólo son válidos para los intervalos de punto de inflamación especificados en cada uno de los distintos métodos.

A la hora de seleccionar el método hay que tener en cuenta las posibles reacciones químicas entre la sustancia y el soporte de la muestra.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El punto de inflamación es la temperatura mínima, corregida a una presión de 101,325 kPa, a la cual un líquido desprende vapores, en las condiciones definidas en el método de ensayo, en una cantidad tal que se produzca una mezcla vapor/aire inflamable en el recipiente del ensayo.

Unidad: °C

$t = T - 273{,}15$

(t en °C y T en K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se examina una nueva sustancia. Su principal función es la de servir para comprobar las características del método de vez en cuando y comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se coloca la sustancia en un recipiente de ensayo y se calienta o se enfría hasta la temperatura de ensayo según el procedimiento descrito en cada método concreto. Se hacen pruebas de ignición para observar si la muestra se inflama o no a la temperatura de ensayo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

1.5.1. **Repetibilidad**

La repetibilidad depende del intervalo del punto de inflamación y del método de ensayo utilizado; máximo 2 °C.

1.5.2. **Sensibilidad**

La sensibilidad depende del método de ensayo utilizado.

1.5.3. **Especificidad**

La especificidad de ciertos métodos de ensayo se limita a algunos intervalos de punto de inflamación y depende de las características de la sustancia (por ejemplo, alta viscosidad).

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Se coloca una muestra de la sustancia problema en un aparato de ensayo, de conformidad con los puntos 1.6.3.1. y/o 1.6.3.2.

Por seguridad, se recomienda para sustancias energéticas o tóxicas seguir un método que exija una muestra pequeña, alrededor de 2 cm^3.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

Se debe instalar el aparato lejos de corrientes de aire, siempre que esto no suponga ningún problema de seguridad.

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

1.6.3.1. *Método de equilibrio*

Véanse las normas ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. *Métodos de no equilibrio*

Aparato Abel:

Véanse las normas BS 2000, parte 170, NF M07-011 y NF T66-009.

Aparato Abel-Pensky:

Véanse las normas EN 57, DIN 51755 primera parte (para temperaturas de 5° a 65 °C), DIN 51755 segunda parte (para temperaturas inferiores a 5 °C) y NF M07-036.

Aparato Tag:

Véase la norma ASTM D-56.

Aparato Pensky-Martens:

Véanse las normas ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 y NF M07-019.

Observaciones:

Cuando el punto de inflamación determinado por un método de no equilibrio del punto 1.6.3.2. tiene los siguientes valores: 0 ± 2° C, 21 ± 2° C o 55 ± 2° C, es conveniente confirmarlo mediante un método de equilibrio utilizando el mismo aparato.

Únicamente se pueden utilizar para la notificación los métodos que puedan dar la temperatura del punto de inflamación.

Para determinar el punto de inflamación de líquidos viscosos (pinturas, gomas, etc.) que contengan disolventes, sólo se pueden utilizar los aparatos y métodos de ensayo que permitan determinar el punto de inflamación de los líquidos viscosos.

Véanse las normas ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 y DIN 53213 primera parte.

2. **RESULTADOS**

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— descripción del método utilizado, así como cualquier desviación,

— los resultados y cualquier otra información u observación que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ninguna.

A.10. INFLAMABILIDAD (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos preliminares sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia antes de proceder al ensayo.

El presente método sólo es aplicable a las sustancias en polvo, granulosas o pastosas.

Para no englobar todas las sustancias que pueden inflamarse, sino únicamente aquellas que se queman muy rápidamente o cuya forma de combustión es, de una forma u otra, particularmente peligrosa, sólo se considerarán como fácilmente inflamables las sustancias cuya velocidad de combustión sobrepase un cierto límite.

Puede ser especialmente peligroso que la incandescencia se propague a través de un polvo metálico debido a las dificultades para apagar un fuego. Los polvos metálicos se considerarán fácilmente inflamables si permiten la difusión de la incandescencia en toda su masa en un tiempo especificado.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo de combustión expresado en segundos.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifican.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia se dispone formando una mecha o cinta continua de unos 250 mm de longitud y se hace un ensayo exploratorio previo para determinar si, al aplicar una llama de gas, se produce la propagación de la combustión con llama o sin ella. Si se produce la propagación a lo largo de 200 mm de la mecha dentro de un tiempo dado, hay que realizar un ensayo completo para determinar la velocidad de combustión.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Ensayo exploratorio previo**

Se pone la sustancia formando una mezcla o cinta continua de unos 250 mm de longitud, 20 mm de anchura y 10 mm de altura, sobre una placa incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica. Una llama fuerte procedente de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm) se aplica a un extremo de la mecha hasta que el polvo empieza a arder o durante un máximo de 2 minutos (5 minutos si se trata de polvos de metales o de aleaciones metálicas). Hay que observar si la combustión se propaga a lo largo de 200 mm de la mecha durante un periodo de prueba de 4 minutos (o 40 minutos si se trata de polvos metálicos). Si la sustancia no se enciende ni propaga la combustión ardiendo con llama o sin ella a lo largo de 200 mm de la mecha en el plazo de 4 minutos (o 40 minutos), entonces la sustancia no debe considerarse fácilmente inflamable y no es necesario seguir con las pruebas. Si la sustancia propaga la combustión a lo largo de 200 mm de longitud de la mecha en menos de 4 minutos (o menos de 40 minutos si se trata de polvos metálicos), hay que aplicar el procedimiento descrito a continuación (puntos 1.6.2. y siguientes).

1.6.2. **Ensayo de la velocidad de combustión**

1.6.2.1. *Preparación*

En el caso de sustancias en polvo o granulosas se vierte la sustancia sin comprimir dentro de un molde de 250 mm de longitud con una sección transversal triangular de 10 mm de altura interior y 20 mm de anchura. A ambos lados del molde, en sentido longitudinal, se colocan dos placas metálicas a modo de soportes laterales, que deben sobrepasar en 2 mm el borde superior de la sección triangular transversal del molde (véase la figura). A continuación se deja caer tres veces el molde desde una altura de 2 cm, sobre una superficie dura. Si es necesario, se completa el molde de nuevo. A continuación, se retiran las placas laterales y se enrasa. Se coloca sobre el molde una placa no combustible, no porosa y de baja conductividad térmica, se le da la vuelta y se desmolda.

Las sustancias pastosas se extienden sobre una superficie no combustible, no porosa y de baja conductividad térmica, formando un cordón de 250 mm de longitud y alrededor de 1 cm^2 de sección.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

En el caso de sustancias sensibles a la humedad, hay que efectuar el ensayo lo más rápidamente posible después de retirar la sustancia del recipiente.

1.6.2.3. *Desarrollo del ensayo*

Colocar el dispósitivo en el tiro de una campana de gases.

La velocidad del aire debe ser suficiente para evitar que los humos pasen al laboratorio y no debe variar mientras dure el ensayo. Alrededor del dispositivo se pondrá una pantalla.

Se utiliza una llama fuerte procedente de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm) para encender un extremo de la sustancia. Cuando la mecha ha ardido a lo largo de 80 mm, se procede a medir la velocidad de combustión a lo largo de los siguientes 100 mm. El ensayo se repite seis veces, usando cada vez una placa fría y limpia, salvo que se obtenga antes un resultado positivo.

2. **RESULTADOS**

Para proceder a la evaluación es preciso conocer el tiempo de combustión del ensayo exploratorio previo (1.6.1) y el menor tiempo de combustión de un máximo de seis ensayos (1.6.2.3)

3. **INFORME**

3.1. **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— descripción de la sustancia de ensayo y su estado físico, incluida la tasa de humedad,

— resultados del ensayo exploratorio previo y del ensayo de velocidad de combustión en su caso,

— cualquier observación complementaria que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

3.2. **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Las sustancias pulverulentas, granulosas o pastosas se deberán considerar fácilmente inflamables cuando el tiempo de combustión de cualquier ensayo efectuado según el procedimiento descrito en 1.6.2. sea inferior a 45 segundos. Deberá considerarse que los polvos metálicos o de aleaciones metálicas son fácilmente inflamables cuando puedan encenderse y la llama o la zona de reacción se extienda a toda la muestra en 10 minutos o menos.

4. **BIBLIOGRAFIA**

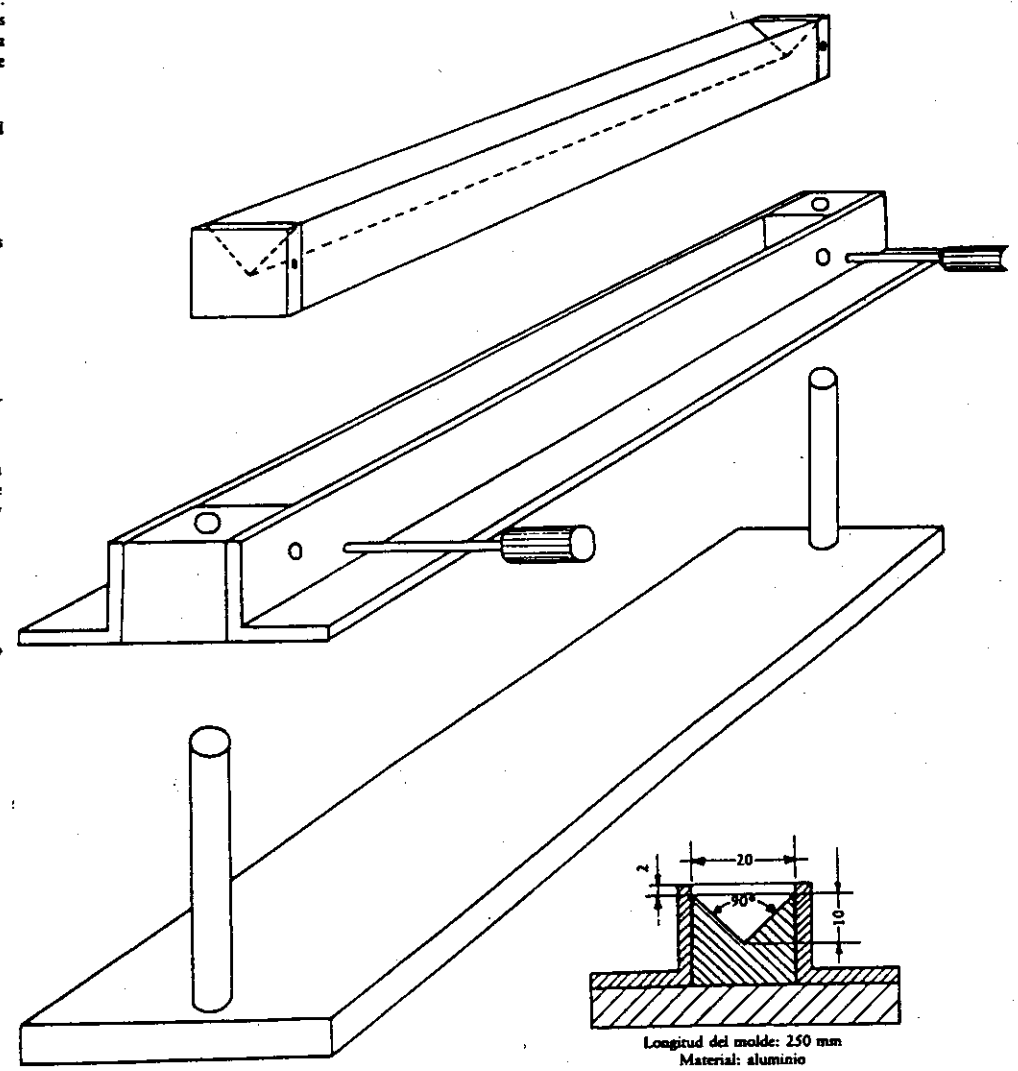
(1) NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Apéndice

Figura

Molde y accesorios necesarios para la formación de las mechas

(todas las dimensiones expresadas en milímetros)



Longitud del molde: 250 mm
Material: aluminio

A.11. INFLAMABILIDAD (GASES)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método permite determinar si los gases mezclados con el aire a temperatura (alrededor de 20 °C) y presión ambiente son inflamables y, en caso positivo, en qué intervalo de concentraciones. Se exponen a una chispa eléctrica mezclas que contengan concentraciones crecientes de gas problema y se observa si se produce la inflamación.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El intervalo de inflamabilidad es el intervalo de concentración entre los límites de explosión superior e inferior. Los límites de explosión superior e inferior son los límites de concentración del gas inflamable en mezcla con el aire a los que el fuego no se propaga.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

No se especifica.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se aumenta gradualmente la concentración del gas en el aire y, en cada etapa, se expone la mezcla a una chispa eléctrica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Equipo

El recipiente de ensayo es un cilindro de cristal de un diámetro interior de al menos 50 mm y una altura mínima de 300 mm, que se pone verticalmente. Los electrodos de ignición distan de 3 a 5 mm uno del otro y están situados a 60 mm del fondo del cilindro. El cilindro está equipado con una válvula para reducir la presión. El aparato debe estar protegido por un blindaje para limitar los daños de una posible explosión.

La fuente de ignición es una chispa inductiva constante de 0,5 segundos de duración, producida por un transformador de alta tensión con una tensión de salida de 10 a 15 kV (la potencia máxima es de 300 W). En la referencia (2) se describe un ejemplo de equipo adecuado.

1.6.2. Condiciones del ensayo

El ensayo debe efectuarse a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.3. Desarrollo del ensayo

Mediante bombas dosificadoras se llena el cilindro de cristal con una mezcla de aire y gas de concentración conocida. Se hace saltar una chispa en esta mezcla y se observa si se desprende una llama de la fuente de ignición y se propaga independientemente. Se irá aumentando la concentración de gas en un 1 % de volumen cada vez, hasta que se produzca la inflamación descrita anteriormente.

Si la estructura química del gas indica que debe ser ininflamable y puede calcularse la composicion de la mezcla estequiométrica con el aire, sólo será necesario someter a ensayo, en etapas del 1 %, mezclas que estén en el intervalo entre el 10 % por debajo y el 10 % por arriba de la composición estequiométrica.

2. RESULTADOS

La propagación de la llama constituye el único dato válido para la determinación de esta propiedad.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— descripción del aparato utilizado, mencionando las dimensiones,

— temperatura en el momento del ensayo,

— concentraciones de ensayo, así como los resultados obtenidos,

— resultado del ensayo: gas no inflamable o fácilmente inflamable,

— si se ha llegado a la conclusión de que el gas no es inflamable, se debe indicar el intervalo de concentraciones que se ha sometido a ensayo en etapas del 1 %,

— cualquier información u observación que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker y H. Schacke. «Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 126-127.

A.12. INFLAMABILIDAD (EN CONTACTO CON EL AGUA)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Este método de ensayo puede utilizarse para determinar si la reacción de una sustancia con el agua o el aire húmedo ocasiona el desprendimiento de una cantidad peligrosa de un gas o de varios gases, que puedan ser fácilmente inflamables.

Puede aplicarse tanto a sustancias sólidas como líquidas, pero no a las sustancias que se inflaman espontáneamente en contacto con el aire.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Sustancias fácilmente inflamables: preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, desprenden una cantidad peligrosa de gases fácilmente inflamables, a una velocidad mínima de 1 l/kg por hora.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo incluye varias fases sucesivas que se describen a continuación; si la inflamación se produce en cualquiera de estas fases no es necesario proseguir el ensayo. Si se sabe que la sustancia no reacciona violentamente con el agua, se pasa directamente a la fase 4 (1.3.4).

1.3.1. Fase 1

Se coloca la sustancia problema en una cubeta que contenga agua destilada a 20 °C y se observa si el gas desprendido se inflama o no.

1.3.2. Fase 2

Se coloca la sustancia de ensayo en un papel de filtro que flote sobre un recipiente lleno de agua destilada a 20 °C y se observa si el gas que se desprende se inflama o no. El papel de filtro sólo sirve para mantener la sustancia en un lugar, lo cual aumenta las probabilidades de inflamación.

1.3.3. Fase 3

Se forma con la sustancia de ensayo una pila de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro, aproximadamente. Se añaden algunas gotas de agua a la pila y se observa si el gas que se desprende se inflama o no.

1.3.4. Fase 4

Se mezcla la sustancia de ensayo con agua destilada a 20 °C y se mide la velocidad de producción de gas durante 7 horas, a intervalos de una hora. Si al cabo de 7 horas la velocidad de producción es variable o va aumentando, debe prolongarse el tiempo de medida hasta un máximo de 5 días. Si, en un momento dado, la velocidad de producción supera 1 l/kg por hora, el ensayo puede darse por acabado.

1.4. SUSTANCIA DE REFERENCIA

No se especifica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

1.6.1. Fase 1

1.6.1.1. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.1.2. *Desarrollo del ensayo*

Se coloca una pequeña cantidad (aproximadamente unos 2 mm de diámetro) de la sustancia problema en una cubeta con agua destilada. Observar: i) si hay desprendimiento de gas y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.2. Fase 2

1.6.2.1. *Equipo*

Papel de filtro flotando sobre una superficie de agua destilada en un recipiente adecuado, como, por ejemplo, una cubeta de evaporación de 100 mm de diámetro.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.2.3. *Desarrollo del ensayo*

Se coloca una pequeña cantidad de la sustancia problema (aproximadamente 2 mm de diámetro) sobre el centro del papel de filtro. Observar: i) si hay desprendimiento de gas y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.3. Fase 3

1.6.3.1. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.3.2. *Desarrollo del ensayo*

Se forma con la sustancia de ensayo una pila de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro, aproximadamente, con un pequeño cráter en la cumbre. Se añaden algunas gotas de agua en el hueco y se observa: i) si hay desprendimiento de gas, ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.4. Fase 4

1.6.4.1. *Equipo*

El equipo se monta según se muestra en la figura.

1.6.4.2. *Condiciones del ensayo*

Hay que asegurarse de que el recipiente que contiene la sustancia problema está libre de partículas pulverulentas (tamaño de partícula < 500 µm). Si éstas representan más del 1% en peso del total, o si la muestra es quebradiza, hay que reducir a polvo la sustancia antes de proceder al ensayo, para tener en cuenta la reducción del tamaño de las partículas durante su almacenamiento y manipulación; en caso contrario, la sustancia se utiliza en su forma original. Debe realizarse el ensayo a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) y a presión atmosférica.

1.6.4.3. *Desarrollo del ensayo*

Se ponen entre 10 y 20 ml de agua en el embudo cuentagotas del equipo y 10 g de sustancia en el matraz cónico. El volumen de gas producido puede medirse con cualquier método adecuado. Se abre la tapa del embudo cuentagotas para que penetre el agua en el matraz cónico y se pone en marcha un cronómetro. Se mide la producción de gas cada hora a lo largo de un periodo de siete horas. Si durante este período la producción de gas es irregular o si al final del periodo la velocidad de producción de gas está en aumento, hay que continuar con las medidas hasta un máximo de cinco días. Si en cualquier momento de la medida la velocidad de producción de gas pasa de 1 l/kg por hora, puede interrumpirse el ensayo. Este ensayo debe realizarse por triplicado.

Si no se conoce la identidad química del gas, debe analizarse éste. Si el gas contiene componentes fácilmente inflamables y si, además, se ignora si el conjunto de la mezcla es fácilmente inflamable, hay que preparar y someter a ensayo una mezcla de la misma composición, de conformidad con el método A.11.

2. RESULTADOS

La sustancia se considera peligrosa si:

— se produce ignición espontánea en cualquier fase del desarrollo del ensayo

o

— se produce gas inflamable a una velocidad superior a 1 l/kg de sustancia por hora.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— datos sobre cualquier preparación inicial de la sustancia problema,

— resultados de los ensayos (fases 1,2,3 y 4),

— identidad química del gas desprendido,

— la velocidad de formación del gas si se realiza la fase 4 (1.6.4),

— cualquier observación complementaria que sea útil para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

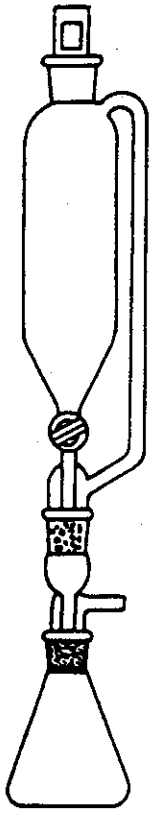
(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

Apéndice

Figura

Equipo



A.13. PROPIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS Y LÍQUIDOS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El procedimiento del ensayo es aplicable a las sustancias sólidas y líquidas que pueden inflamarse espontáneamente poco tiempo después de haber entrado en contacto con el aire a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

Este método de ensayo no puede aplicarse a las sustancias que tienen que exponerse al aire durante varias horas o días a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas antes de inflamarse.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Se considera que una sustancia tiene propiedades pirofóricas si, en las condiciones descritas en 1.6, se inflama o se carboniza.

También puede ser necesario estudiar la autoinflamabilidad de líquidos según el método A.15 Temperatura de autoinflamación (líquidos y gases).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifican.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se añade la sustancia, sea sólida o líquida, a un soporte inerte y se pone en contacto con el aire a temperatura ambiente durante un período de cinco minutos. Si las sustancias líquidas no se inflaman, entonces se absorben en papel de filtro y se exponen al aire a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) durante cinco minutos. Si un sólido o líquido se inflama, o un líquido inflama o carboniza a un papel de filtro, entonces se considera que la sustancia es pirofórica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Repetibilidad: debido a la importancia en relación con la seguridad, un solo resultado positivo será suficiente para considerar que la sustancia es pirofórica.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. Equipo

Llenar una cubeta de porcelana de unos 10 cm de diámetro con una capa de tierra de infusorios, de unos 5 mm de espesor, a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

Observaciones:

La tierra de infusorios, o cualquier otra sustancia inerte equivalente que se obtenga fácilmente, se tomará como representativa de suelo sobre el que pudiera esparcirse la sustancia en caso de accidente.

El papel de filtro seco es necesario para el ensayo de los líquidos que no se inflaman en contacto con el aire cuando están unidos a un soporte inerte.

1.6.2. Realización del ensayo

a) *Sólidos pulverulentos*

Se vierte 1 o 2 cm³ de la sustancia problema, desde una altura de alrededor de 1 m, sobre una superficie no combustible y se observa si la sustancia se inflama durante la caída o durante los primeros cinco minutos después de depositarse.

El ensayo se realiza seis veces, salvo que se produzca ignición.

b) *Líquidos*

Se vierten 5 cm³ del líquido problema en la cubeta de porcelana preparada y se observa si la sustancia se inflama en un tiempo de cinco minutos.

Si no se observa inflamación durante estos seis ensayos, hay que realizar los siguientes ensayos:

Con una jeringuilla se ponen 0,5 ml de la sustancia en un papel de filtro dentado y se observa si se produce inflamación o carbonización del papel de filtro en el plazo de cinco minutos desde la adición del líquido. El ensayo se realiza tres veces, salvo que se produzca inflamación o carbonización.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El ensayo puede interrumpirse tan pronto como se obtenga un resultado positivo en cualquiera de las pruebas.

2.2. EVALUACIÓN

Una sustancia se considera pirofórica si se inflama en el plazo de cinco minutos cuando se añade a un soporte inerte y se expone al aire, o bien cuando la sustancia líquida carboniza o inflama un papel de filtro en el plazo de cinco minutos desde que se pone en contacto con éste y se expone al aire.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— resultado del ensayo,

— cualquier observación complementaria que sea útil para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

A.14. PROPIEDADES EXPLOSIVAS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Se trata de un método de ensayo que permite determinar si una sustancia sólida o pastosa presenta o no peligro de explosión cuando se expone al efecto de una llama (sensibilidad térmica) o a un choque o fricción (sensibilidad a estímulos mecánicos), y si una sustancia líquida presenta peligro de explosión cuando se expone al efecto de una llama o un choque.

El método comprende tres partes:

a) un ensayo de sensibilidad térmica (1);

b) un ensayo de sensibilidad mecánica respecto al choque (1);

c) un ensayo de sensibilidad mecánica respecto a la fricción (1).

El método proporciona datos que permiten evaluar la probabilidad de inicio de una explosión por medio de algunos estímulos corrientes. No tiene por objeto determinar si una sustancia puede o no hacer explosión en cualesquiera condiciones.

El método sirve para determinar si una sustancia presenta peligro de explosión (sensibilidad térmica y mecánica) en las condiciones específicas definidas por la Directiva. En el ensayo se utiliza un cierto número de equipos ampliamente utilizados internacionalmente (1) y que, por regla general, dan resultados convincentes. Hay que reconocer que el método no es definitivo. Pueden utilizarse equipos distintos a los especificados siempre que estén reconocidos internacionalmente y se pueda establecer una buena correlación entre los resultados obtenidos con el equipo alternativo y los del equipo especificado.

No es necesario realizar los ensayos si los datos termodinámicos disponibles (calor de formación, calor de descomposición, etc.) o la ausencia de ciertos grupos reactivos (2) en la fórmula desarrollada permiten establecer de forma razonablemente inequívoca que la sustancia no puede descomponerse rápidamente con formación de gases o liberación de calor (dicho de otro modo, si la materia no presenta ningún riesgo de explosión). No es necesario realizar un ensayo de sensibilidad a la fricción con las sustancias líquidas.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Explosivos:

Sustancias que puedan hacer explosión bajo el efecto de una llama, o que sean sensibles al choque o a la fricción en el equipo especificado (o que sean más sensibles mecánicamente que el 1,3-dinitrobenceno en un equipo alternativo).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

1,3-dinitrobenceno, producto cristalino técnico pasado por tamiz de 0,5 mm, para los métodos de fricción y choque.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX, hexogen, ciclonita — CAS 121-82-4), recristalizado a partir de ciclohexanona acuosa, tamizado por vía húmeda a través de un tamiz de 250 um y retenido en un tamiz de 150 µm y secado a 103 ± 2 °C durante 4 horas para la segunda serie de ensayos de fricción y choque.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se debe realizar un ensayo preliminar para determinar las condiciones de seguridad que deben presidir la ejecución de los tres ensayos de sensibilidad.

1.4.1. Pruebas de seguridad en la manipulación (3)

Por razones de seguridad, antes de pasar a los ensayos principales, se someten muestras muy reducidas (unos 10 mg) de sustancia a un calentamiento sin confinamiento con llama de gas, a choque con cualquier tipo de instrumento adecuado y a fricción utilizando un mazo y un yunque, o cualquier otro tipo de instrumento que sirva para producir fricción. El objetivo es determinar si la sustancia es tan sensible y explosiva que, los ensayos de sensibilidad prescritos, especialmente el de sensibilidad térmica, deban realizarse con precauciones especiales a fin de evitar cualquier daño corporal al operario.

1.4.2. Sensibilidad térmica

Este método consiste en calentar la sustancia en un tubo de acero cerrado por placas horadadas con agujeros de diferentes diámetros, para determinar si la sustancia puede hacer explosión en condiciones de calor intenso y un confinamiento determinado.

1.4.3. Sensibilidad mecánica (choque)

El método consiste en someter la sustancia al choque producido por una masa especificada que se deja caer desde una altura también especificada.

1.4.4. Sensibilidad mecánica (fricción)

Este método consiste en someter la sustancia sólida o pastosa a una fricción entre superficies tipo, en condiciones específicas de carga y de movimiento relativo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Sensibilidad térmica (efecto de la llama)

1.6.1.1. *Equipo*

El equipo consiste en un tubo de acero no reutilizable con un sistema de cierre reutilizable (figura 1), instalado en un instrumento de calefacción y protección. Cada tubo se obtiene por embutido de una lámina de acero (véase el apéndice) y tiene 24 mm de diámetro interior, 75 mm de longitud y 0,5 mm de espesor de pared. Los tubos tienen un reborde en el extremo abierto para que se puedan cerrar con el dispositivo de la placa horadada. Este dispositivo consiste en una placa horadada resistente a la presión, con un orificio central, unido firmemente al tubo mediante una junta aterrajada en dos partes (tuerca y abrazadera de rosca); esta junta está hecha de acero al cromo-manganeso (véase el apéndice) exento de chispas hasta 800 °C. Las placas horadadas tienen 6 mm de espesor, están hechas de acero resistente al calor (véase el apéndice) y pueden escogerse con varios diámetros de abertura.

1.6.1.2. *Condiciones del ensayo*

Normalmente se somete a ensayo la sustancia tal como llega al laboratorio, aunque en algunos casos (por ejemplo, si está prensada, fundida o condensada de alguna otra forma) puede ser necesario estudiar la sustancia después de triturarla.

Si se trata de un sólido, la masa de material que debe utilizarse en cada ensayo se determina mediante un proceso seco de dos fases. Se llena un tubo tarado con 9 cm^3 de sustancia y ésta se apisona aplicando una fuerza de 80 N a toda la sección transversal del tubo. La forma de llenar el tubo puede ser distinta por razones de

seguridad o en caso de que la forma física de la muestra pueda cambiar por la compresión; por ejemplo, si la sustancia es muy sensible a la fricción, no puede apisonarse. Si el material es compresible, se añade más cantidad y se vuelve a apisonar hasta que la altura del relleno queda a 55 mm de la boca. Se determina la masa total utilizada para llenar el tubo hasta el nivel de 55 mm y se hacen dos adiciones más, cada una apisonada con una fuerza de 80 N. Entonces, según sea necesario, se añade más material y se apisona o bien se extrae para dejar la altura del relleno a 15 mm de la boca. Se lleva a cabo un segundo proceso seco, empezando con una cantidad igual a un tercio de la masa total utilizada en el primer proceso seco, y se apisona esta cantidad. Se añaden otros dos incrementos de esta cantidad con apisonamiento de 80 N y se ajusta el nivel de la sustancia en el tubo a 15 mm de la boca por adición o extracción de material, según sea necesario. La cantidad de sólido determinada en el segundo proceso seco es la que se utilizará en cada ensayo; el llenado se hace en tres cantidades iguales, comprimida cada una a 9 cm^3 mediante la fuerza que sea necesaria. (Puede ser más fácil utilizar anillos separadores.)

Los líquidos y geles se cargan en el tubo hasta una altura de 60 mm teniendo especial cuidado con los geles para evitar la formación de vacíos. La abrazadera de rosca se desliza sobre el tubo desde el fondo, se inserta la placa horadada correspondiente y se aprieta la tuerca después de poner un lubricante a base de disulfuro de molibdeno. Es muy importante comprobar que no queda nada de sustancia aprisionada entre el reborde y la placa o en las roscas.

La fuente de calor es propano procedente de una botella industrial, provisto de un regulador de presión (60 a 70 mbar), que pasa a través de un contador y mediante un distribuidor se reparte en cuatro mecheros de forma equilibrada (lo que se comprueba por observación visual de las llamas de los mecheros). Los mecheros se colocan alrededor del recinto de ensayo según se indica en la figura 1. Los cuatro mecheros suponen un consumo total de unos 3,2 litros de propano por minuto. Pueden utilizarse otros mecheros y gases combustibles pero la velocidad de calentamiento debe ser la especificada en la figura 3. Independientemente del equipo utilizado, es necesario comprobar periódicamente la velocidad de calentamiento mediante tubos llenos de ftalato de dibutilo, según se indica en la figura 3.

1.6.1.3. *Desarrollo de los ensayos*

Cada ensayo se realiza hasta que el tubo esté fragmentado o el tubo se haya calentado durante cinco minutos. Si el ensayo produce la fragmentación del tubo en tres o más piezas, que en algunos casos pueden estar unidas entre sí por bandas estrechas de metal, según ilustra la figura 2, entonces se considera que el ensayo produce explosión. Un ensayo en que se produzcan menos fragmentos o no haya fragmentación se considera que no produce explosión.

Se hace primero una serie de tres ensayos con una placa de 6,0 mm de diámetro de orificio y, si no se obtienen explosiones, se hace una segunda serie de tres ensayos con una placa de 2,0 mm de diámetro de orificio. Desde el momento en que se produzca una explosión en cualquiera de las dos series de ensayos no es necesario seguir realizando ensayos.

1.6.1.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión en cualquiera de las dos series de ensayos.

1.6.2. **Sensibilidad mecánica (choque)**

1.6.2.1. *Equipo (figura 4)*

Las partes fundamentales de un equipo clásico de martinete son un bloque de acero fundido con base, yunque, columna, guías, pesos que caen, mecanismo de liberación y un soporte para las muestras. El yunque de acero (100 mm de diámetro por 70 mm de altura) se atornilla a la parte superior de un bloque de acero (230 mm de longitud por 250 mm de anchura por 200 mm de altura) con una base de fundición (450 mm de longitud por 450 mm de anchura por 60 mm de altura). En un soporte atornillado a la parte posterior del bloque de acero se fija la columna, hecha de tubo de acero estirado sin costuras. El aparato se fija con cuatro tornos a un bloque macizo de hormigón (de 60 × 60 × 60 cm) de forma que los railes de guía sean absolutamente verticales y el peso caiga en caída libre. Pueden utilizarse pesos de 5 y 10 kg, de acero macizo. La cabeza de choque de cada peso está hecha de acero templado HRC 60 a 63 y tiene un diámetro mínimo de 25 mm.

La muestra problema se pone en un dispositivo de choque, formado por dos cilindros coaxiales de acero macizo, uno encima del otro, en un anillo de guía de acero en forma de cilindro hueco. Los cilindros de acero macizo deben tener 10 (−0,003, −0,005) mm de diámetro y 10 mm de altura, sus superficies deben estar pulidas, los bordes redondeados (0,5 mm de radio de curvatura) y su dureza debe ser de HRC 58 a 65. El cilindro hueco debe tener 16 mm de diámetro exterior, un orificio pulido de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm y 13 mm de altura. El dispositivo de choque se monta sobre un yunque intermedio (26 mm de diámetro y 26 mm de altura) hecho de acero y centrado por un anillo con perforaciones que dejen escapar los humos.

1.6.2.2. *Condiciones de ensayo*

El volumen de muestra debe ser de 40 mm^3, o bien un volumen adecuado para otro tipo de aparato alternativo. Las sustancias sólidas deben someterse a ensayo en estado seco y prepararse de la forma siguiente:

a) las sustancias en polvo se pasan por tamiz de 0,5 mm; para las pruebas se usa la fracción que haya atravesado el tamiz;

b) las sustancias prensadas, fundidas o condensadas de alguna otra forma se trituran en fragmentos pequeños y se tamizan; la fracción de diámetro comprendido entre 0,5 y 1 mm es la que se utiliza para los ensayos y debe ser representativa de la sustancia original.

Las sustancias normalmente suministradas como pastas se someterán a ensayos en el estado más seco posible o en algún caso, suprimiendo al máxima posible la cantidad de diluyente. Las sustancias líquidas se estudiarán dejando una separación de 1 mm entre el cilindro de acero superior y el inferior.

1.6.2.3. *Desarrollo de los ensayos*

Se ejecuta una serie de seis ensayos dejando caer la masa de 10 kg desde la altura de 0,40 m (40 J). Si se obtiene alguna explosión en esta serie de 40 J, hay que realizar otra serie de 6 ensayos, dejando caer la masa de 5 kg desde la altura de 0,15 m (7,5 J). En otros equipos, se compara la muestra con la sustancia de referencia elegida según un procedimiento establecido (por ejemplo, técnica de subida y bajada, etc).

1.6.2.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión (una inflamación y/o una detonación es equivalente a una explosión) al menos una vez en cualquiera de los ensayos con el equipo de choque especificado o si la muestra es más sensible que el 1,3-dinitrobenceno o el RDX en un ensayo de choque alternativo.

1.6.3. **Sensibilidad mecánica (fricción)**

1.6.3.1. *Equipo (figura 5)*

El equipo para el ensayo de fricción consiste en una base de acero fundido sobre la que se monta el dispositivo de fricción. Este consiste en una espiga fija de porcelana y un plato de porcelana móvil. El plato de porcelana se fija a una corredera que se desplaza sobre dos rieles. La corredera se conecta a un motor eléctrico por medio de una barra de conexión, una leva y un engranaje de transmisión adecuado, de forma que el plato de porcelana se desplace una sola vez hacia atrás y hacia adelante por debajo de la espiga de porcelana a lo largo de 10 mm. La espiga de porcelana puede cargarse, por ejemplo, con 120 o 360 N.

Los platos planos de porcelana están hechos de porcelana técnica blanca (rugosidad entre 9 y 32 µm) y sus dimensiones son 25 mm de longitud, 25 mm de anchura y 5 mm de altura. La espiga cilíndrica de porcelana también es de porcelana técnica blanca, mide 15 mm de longitud y 10 mm de diámetro y sus superficies extremas son esféricas y rugosas, con un radio de curvatura de 10 mm.

1.6.3.2. *Condiciones de los ensayos*

El volumen de la muestra debe ser de 10 mm^3, o bien un volumen adecuado para otro tipo de aparato alternativo.

Las sustancias sólidas se someten a ensayo en estado seco y se preparan de la forma siguiente:

a) las sustancias en polvo se pasan por tamiz de 0,5 mm; para las pruebas se utiliza toda la fracción que haya atravesado el tamiz;

b) las sustancias prensadas, fundidas o condensadas de alguna otra forma se trituran en fragmentos pequeños y se tamizan; para los ensayos se utiliza la fracción de diámetro inferior a 0,5 mm.

Las sustancias normalmente suministradas como pastas se someterán a ensayos en el estado más seco posible. Si la sustancia no puede ser preparada en estado seco, la pasta (suprimiendo al máximo posible la cantidad de diluyente) es sometida a ensayo en forma de película de 0,5 mm de espesor, 2 mm de anchura y 10 mm de longitud, preparada con una plantilla.

1.6.3.3. *Desarrollo de los ensayos*

Se pone sobre la muestra la espiga de porcelana y se aplica la carga. Al realizar el ensayo, las marcas esponjosas del plato de porcelana deben ser transversales a la dirección del movimiento. Hay que vigilar para que la espiga se apoye en la muestra, que haya bastante sustancia problema bajo la espiga y que el plato se mueva correctamente bajo la espiga. En el caso de sustancias pastosas, para aplicar la sustancia al plato se utiliza un dosificador de 0,5 mm de espesor con una ranura de 2 × 10 mm. El plato de porcelana tiene que desplazarse 10 mm hacia adelante y hacia atrás bajo la espiga en el plazo de 0,44 segundos. Cada parte de la superficie del plato y de la espiga debe utilizarse sólo una vez; los dos extremos de cada espiga sirven para dos ensayos y cada una de las dos superficies de un plato sirve para tres ensayos.

Se ejecuta una serie de seis pruebas con una carga de 360 N. Si se obtiene algún resultado positivo durante estas seis pruebas, hay que realizar otra serie de seis pruebas con una carga de 120 N. En otros equipos, se compara la muestra con la sustancia de referencia elegida mediante un procedimiento establecido (por ejemplo, técnica de subida y bajada, etc.)

1.6.3.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión (una crepitación y/o una detonación o una inflamación equivale a una explosión) al menos una vez en cualquiera de las pruebas con el equipo especificado de fricción o si se satisfacen los criterios equivalentes de otro ensayo alternativo de fricción.

2. RESULTADOS

En principio, se considera que una sustancia presenta peligro de explosión en el sentido de la Directiva si se obtiene un resultado positivo en el ensayo de sensibilidad térmica, al choque o a la fricción.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— identidad, composición, pureza, grado higrométrico, etc., de la sustancia que se somete a ensayo,

— forma física de la muestra y si se ha triturado, fragmentado o tamizado,

— observaciones durante los ensayos de sensibilidad térmica (por ejemlo, masa de la muestra, número de fragmentos, etc.),

— observaciones durante los ensayos de sensibilidad mecánica (por ejemplo, formación de cantidades considerables de humo o descomposición completa sin detonación, llamas, chispas, crepitación, etc.),

— resultado de cada tipo de ensayo,

— si se ha utilizado otro aparato alternativo, hay que indicar la justificación científica de dicha utilización, así como las pruebas de correlación entre los resultados obtenidos con el aparato especificado y los obtenidos con aparatos equivalentes,

— cualquier observación que se considere útil, por ejemplo, referencia a ensayos realizados con productos similares, que puedan ser importantes para la interpretación correcta de los resultados,

— cualquier otra observación importante para la interpretación de los resultados.

3.2. INTERPRETACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

El informe debe indicar los resultados que se consideren erróneos, anormales o no representativos. Cuando se rechace un resultado, se facilitará una explicación y se indicarán los resultados del ensayo sustitutivo o complementario. Si un resultado anormal no pudiera explicarse, se deberá aceptar el valor obtenido y se utilizará para clasificar la sustancia en consecuencia.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, Londres, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. y Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 y 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

Apéndice

Ejemplo de especificación de material para el ensayo de sensibilidad térmica (véase DIN 1623)

(1) Tubo: especificación de material nº 1.0336.505 g

(2) Placa horadada: especificación de material nº 1.4873

(3) Tuerca y abrazadera de rosca: especificación de material nº 1.3817

Figura 1

Equipo para el ensayo de sensibilidad térmica

(dimensiones en milímetros)

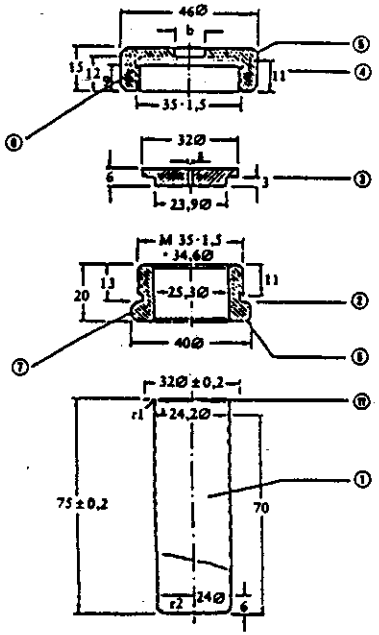


Fig. 1a Tubo de acero y accesorios

(1) tubo
(1a) reborde
(2) abrazadera de rosca; rosca de baja fricción
(3) placa horadada a = 2,0 o 6,0 mm de diámetro
(4) tuerca b = 10 mm de diámetro
(5) chaflán
(6) dos bateas para llave del 41

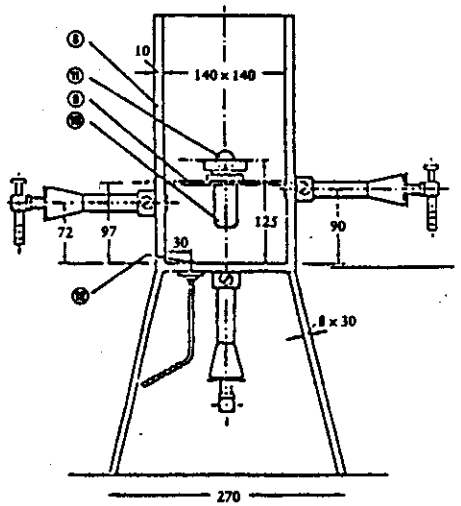
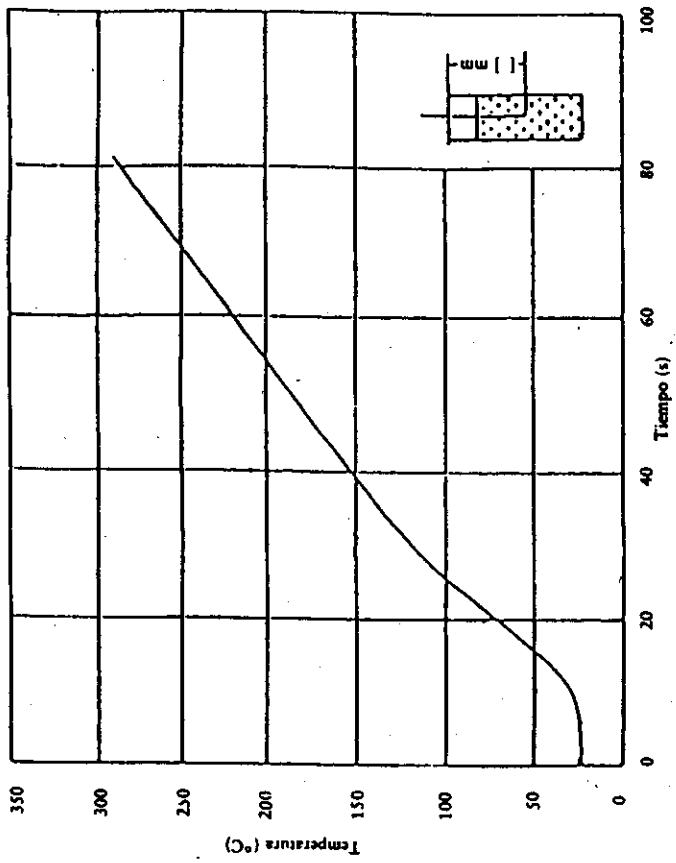


Fig. 1b Instrumento de calefacción y protección

(7) dos bateas por llave del 36
(8) recinto inastillable
(9) dos barras para sujetar el tubo
(10) tubo montado
(11) posición del mechero trasero, los otros mecheros son visibles en la figura
(12) llama piloto

Figura 3

Calibración de la velocidad de calentamiento en el ensayo de sensibilidad térmica



Curva temperatura/tiempo obtenida al calentar frasco de dibutilo (27 cm³) en un tubo cerrado (placa con orificio de 1,5 mm) utilizando un caudal de propano de 3,2 l/min. La temperatura se mide con un termopar de 1 mm de diámetro de alumel/cromel revestido de acero inoxidable, situado en el centro a 43 mm por debajo del borde del tubo. La velocidad de calentamiento entre 135 °C y 285 °C debe estar entre 185 y 215 K/min.

Figura 2

Ensayo de sensibilidad térmica

Ejemplos de fragmentación

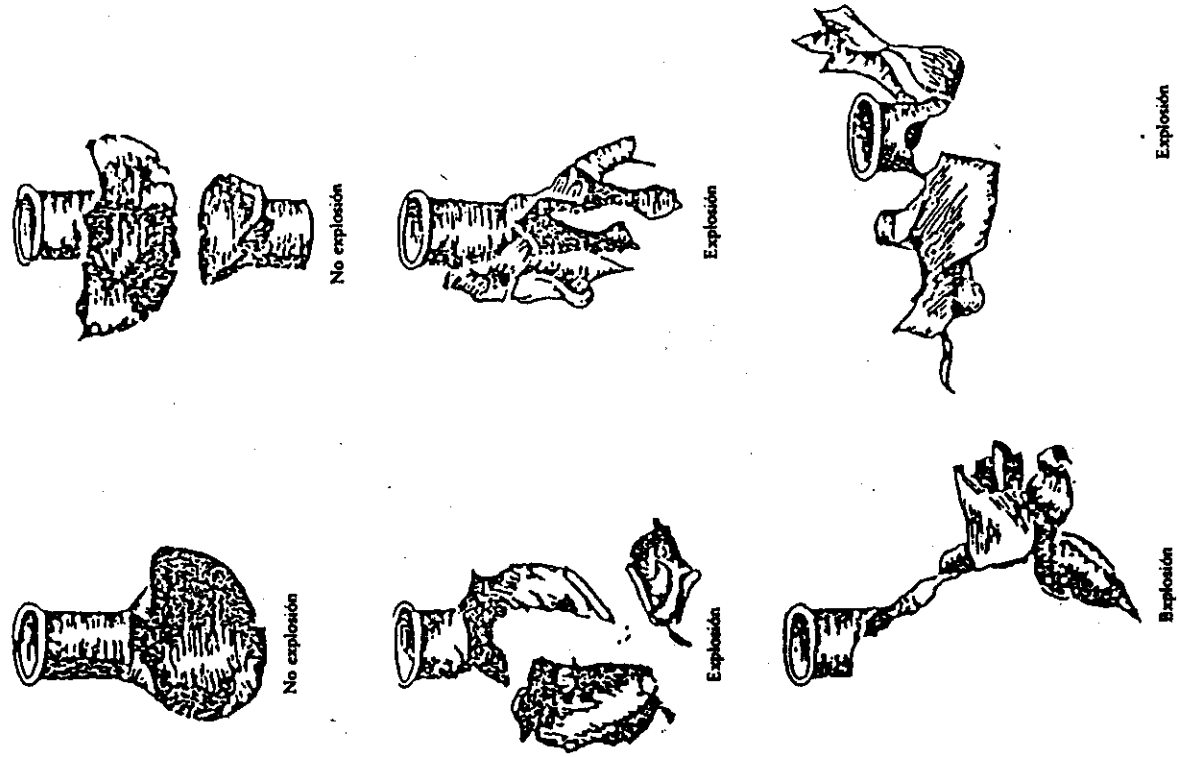


Figura 4

Equipo del ensayo de choque

(dimensiones en milímetros)

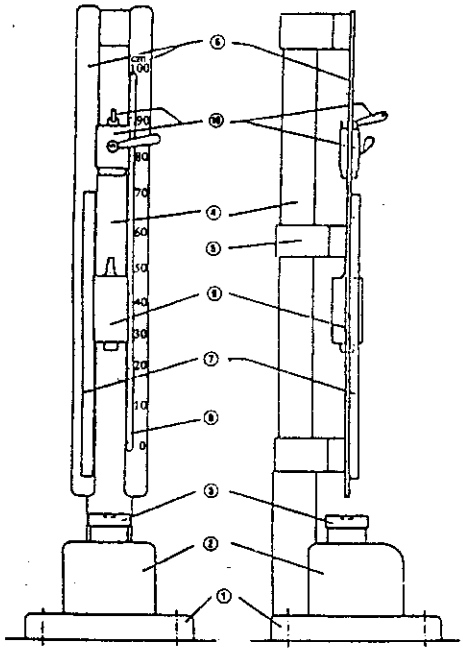


Fig. 4a Martinete, vista general frontal y lateral

(1) base, 450 × 450 × 60
(2) bloque de acero 230 × 250 × 200
(3) yunque, 100 diámetro × 70
(4) columna
(5) travesaño medio
(6) 2 raíles
(7) soporte dentado
(8) escala graduada

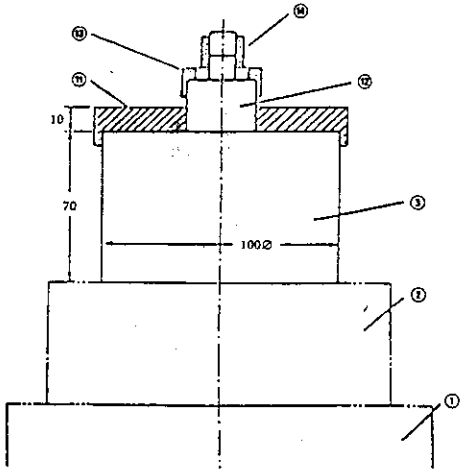


Fig. 4b Martinete, parte inferior

(9) martinete (masa que cae)
(10) instrumento de sujeción y liberación
(11) placa de sujeción
(12) yunque intermedio (intercambiable), 26 diámetro × 26
(13) anillo de sujeción con orificios
(14) dispositivo de choque

Figura 4

Continuación

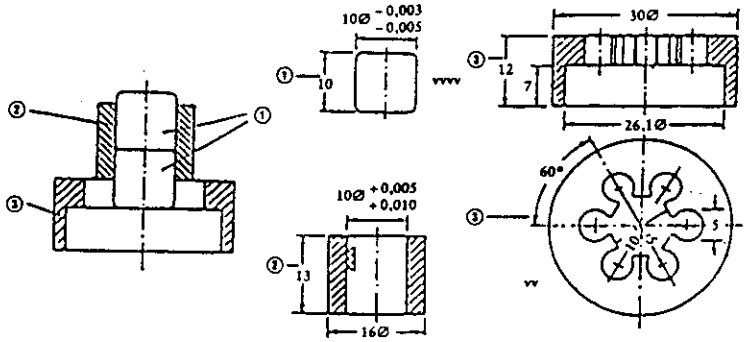
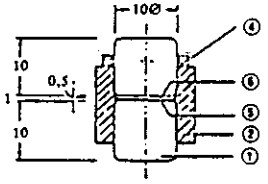


Fig. 4c Dispositivo de choque para sustancias en polvo o pastosas

(1) cilindros de acero
(2) anillo de guía para los cilindros de acero
(a) sección vertical
(b) planta
(4) arandela decaucho
(5) sustancia líquida (40 mm³)
(6) espacio libre de líquido

Fig. 4d Dispositivo de choque para sustancias líquidas



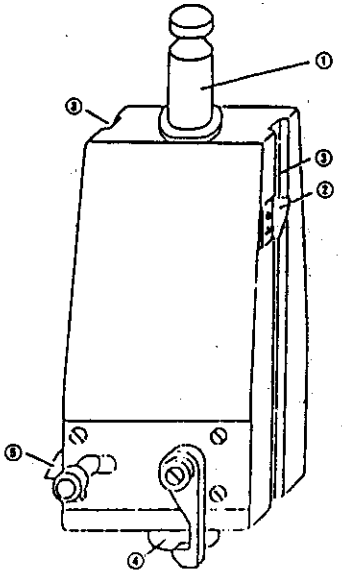


Fig. 4e Martillo (masa de 5 kg)

(1) espiga de suspensión
(2) marcador de altura
(3) ranura de colocación
(4) cabeza cilíndrica de choque
(5) pestillo contra el rebote

Figura 5

Equipo de sensibilidad a la fricción

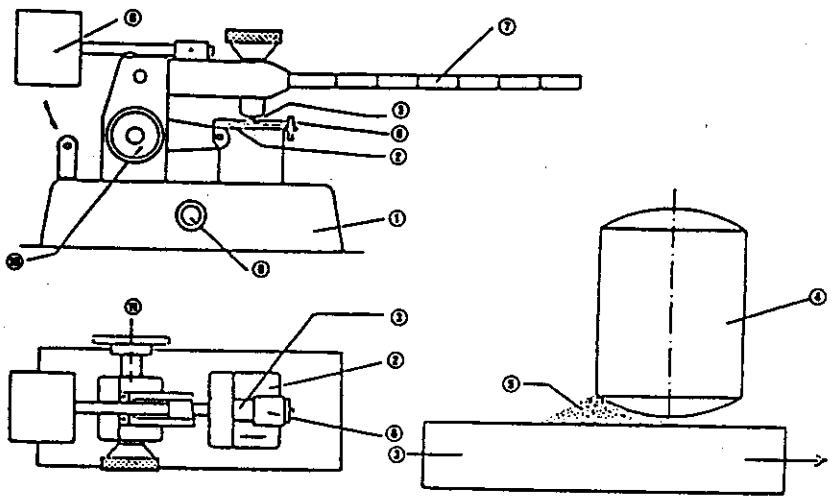


Fig. 5a Equipo de fricción: vista de frente y planta

(1) base de acero
(2) corredera móvil
(3) plato de porcelana, 25 × 25 × 5 mm, sujeto a la corredera
(4) espiga fija de porcelana 10 diámetro × 15 mm
(5) muestra problema, unos 10 mm³
(6) soporte de la espiga

Fig. 5b Posición inicial de la espiga sobre la muestra

(7) brazo de carga
(8) contrapeso
(9) interruptor
(10) rueda para situar la corredera en la posición inicial
(11) al motor eléctrico

A.15. TEMPERATURA DE AUTOINFLAMACIÓN (LÍQUIDOS Y GASES)

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

No deben someterse a este ensayo las sustancias explosivas ni las que empiecen a arder espontáneamente en contacto con el aire a temperatura ambiente. El procedimiento de ensayo es aplicable a gases, líquidos y vapores que, en presencia de aire, puedan inflamarse por el contacto con una superficie caliente.

La temperatura de autoinflamación puede reducirse considerablemente por la presencia de impurezas catalíticas, por el material de la superficie o por un mayor volumen del recipiente de ensayo.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El grado de autoinflamabilidad se expresa en términos de temperatura de autoinflamación. La temperatura de autoinflamación es la temperatura más baja a la que se inflama la sustancia problema, en presencia del aire y en las condiciones definidas por el método de ensayo.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Las sustancias de referencia se citan en las normas (véase el punto 1.6.3.). Sirven fundamentalmente para comprobar las características del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método determina la temperatura mínima de la superficie interna de un recinto que provoca la inflamación de un gas, vapor o líquido inyectado en el recinto.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad varía según el intervalo de temperatura de autoinflamación y el método de ensayo utilizado.

La sensibilidad y la especificidad dependen del método de ensayo utilizado.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Equipo

El equipo se describe en el método que se indica en el punto 1.6.3.

1.6.2. Condiciones del ensayo

Se somete a ensayo una muestra de la sustancia problema según el método indicado en el punto 1.6.3.

1.6.3. Desarrollo del ensayo

Véanse las normas CEI-79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056 y NF T 20-037.

2. **RESULTADOS**

Registrar la temperatura de ensayo, la presión atmosférica, la cantidad de muestra utilizada y el intervalo de tiempo que transcurre hasta que se produce la inflamación.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— cantidad de muestra utilizada, presión atmosférica,

— equipo utilizado,

— resultados de las medidas (temperaturas de ensayo, resultados relativos a la inflamación, intervalos de tiempo correspondientes),

— cualquier observación complementaria que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

Ninguna.

A.16. TEMPERATURA RELATIVA DE AUTOINFLAMACIÓN DE SÓLIDOS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias explosivas y las sustancias que se inflaman espontáneamente en contacto con el aire a temperatura ambiente no deben someterse a este ensayo.

El objetivo del ensayo es proporcionar datos preliminares sobre la autoinflamabilidad de las sustancias sólidas a altas temperaturas.

Si el calor producido, bien por reacción de la sustancia con el oxígeno o bien por descomposición exotérmica, no se disipa con la suficiente rapidez en el ambiente, el autocalentamiento ocasiona la autoinflamación. La autoinflamación se produce, en consecuencia, cuando la velocidad de producción de calor sobrepasa la velocidad de disipación.

El procedimiento es útil como ensayo de selección preliminar para las sustancias sólidas. Teniendo en cuenta la naturaleza compleja de la inflamación y de la combustión de los sólidos, la temperatura de autoinflamación determinada según este método sólo debe servir para hacer comparaciones.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La temperatura de autoinflamación, tal como se determina por este método, es la temperatura ambiente mínima, expresada en grados centígrados (°C), a la que se inflama cierto volumen de una sustancia en condiciones definidas.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se coloca un volumen definido de la sustancia problema en un horno a temperatura ambiente; se registra la curva de temperatura en el centro de la muestra frente al tiempo, elevando la temperatura del horno hasta 400 °C o hasta el punto de fusión, si éste es menor, a razón de 0,5 °C por minuto. La temperatura del horno a la que la temperatura de la muestra alcanza los 400 °C por autocalentamiento es la que, a fines del presente ensayo, se denomina temperatura de autoinflamación.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Equipo

1.6.1.1. *Horno*

Horno de laboratorio con temperatura programable (volumen: unos 2 litros) equipado con circulación natural de aire y una válvula de explosión. Se debe evitar que los gases de descomposición entren en contacto con las resistencias eléctricas para evitar cualquier peligro de explosión.

1.6.1.2. *Cubo de tela de alambre*

Siguiendo el modelo de la figura 1, se corta un pedazo de tela metálica de acero inoxidable con abertura de 0,045 mm. Se dobla la tela metálica y se sujeta con alambre para formar un cubo abierto por la parte superior.

1.6.1.3. *Termopares*

Termopares apropiados.

1.6.1.4. *Registro*

Cualquier registro de dos canales, calibrado en el intervalo de 0 a 600 °C o a una tensión correspondiente.

1.6.2. Condiciones del ensayo

El ensayo se efectúa con las sustancias tal y como se reciben.

1.6.3. Desarrollo del ensayo

Se llena el cubo con la sustancia problema, se comprime con cuidado y se añade más sustancia hasta llenar por completo el cubo. Se suspende éste en el centro del horno a temperatura ambiente. Se coloca un termopar en el centro del cubo y otro entre el cubo y la pared del horno para registrar la temperatura de este último.

Las temperaturas del horno y de la muestra se registran continuamente elevando la temperatura del horno hasta los 400 °C o hasta el punto de fusión del sólido, si este valor es menor, a razón de 0,5 °C por minuto.

Cuando la sustancia se inflame, el termopar colocado en la muestra indicará una subida muy fuerte de la temperatura por encima de la temperatura del horno.

2. RESULTADOS

La temperatura del horno a la que la temperatura de la muestra alcanza los 400 °C por autocalentamiento es significativa para la evaluación (véase la figura 2).

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— descripción de la sustancia problema,

— resultados de las medidas, incluida la curva de temperatura-tiempo,

— todas las observaciones complementarias que sean útiles para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperatura of the spontaneous flammability of solids.

Figura 1

Modelo de cubo de ensayo de 20 mm

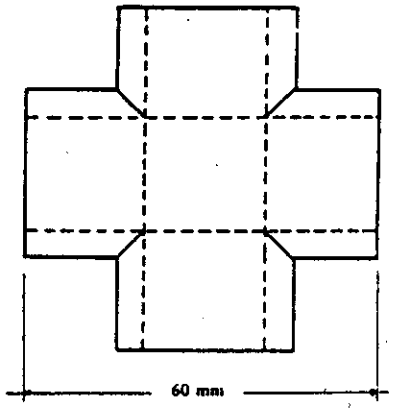
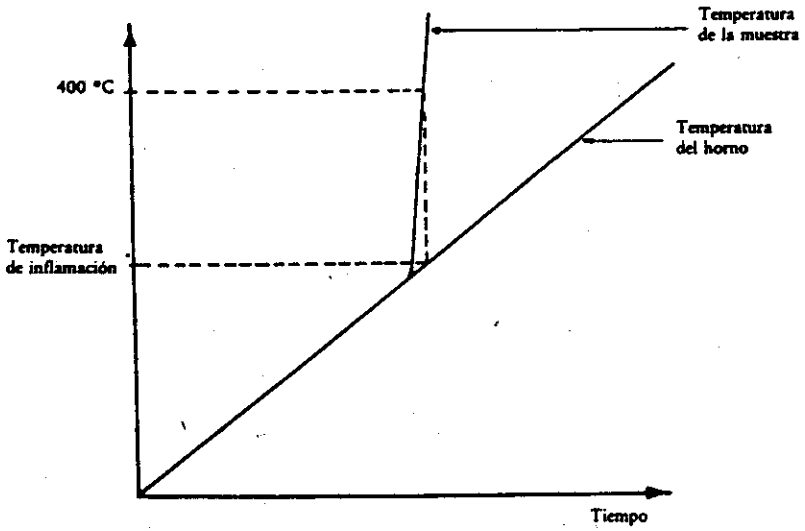


Figura 2

Curva tipo temperatura/tiempo



A.17. PROPIEDADES COMBURANTES (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de información previa sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Este ensayo no es aplicable a líquidos, gases, sustancias explosivas o fácilmente inflamables ni a los peróxidos orgánicos.

Este ensayo es innecesario cuando el examen de la estructura química ponga de manifiesto que la sustancia no puede dar reacción exotérmica con un combustible.

Para saber si en este ensayo hay que tomar precauciones especiales, debe efectuarse una prueba preliminar.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo de combustión: tiempo de reacción, expresado en segundos, necesario para que la zona de reacción se propague a través de la pila, según el procedimiento descrito en el punto 1.6.

Velocidad de combustión: expresada en milímetros por segundo.

Velocidad máxima de combustión: el valor más elevado entre las velocidades de combustión obtenidas con mezclas que contengan desde un 10 a un 90 % en peso de oxidante.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como sustancia de referencia se utiliza nitrato de bario (de grado analítico) tanto para el ensayo como para el ensayo preliminar.

La mezcla de referencia es la mezcla compuesta por nitrato de bario y celulosa en polvo, preparada según lo indicado en el punto 1.6, que tiene la velocidad máxima de combustión (se trata, generalmente, de una muestra con un 60 % en peso de nitrato de bario).

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Por razones de seguridad se procede a un ensayo preliminar. Este ensayo será, por sí solo, suficiente si durante el mismo se observa claramente que la sustancia problema tiene propiedades comburantes. En caso contrario, la sustancia deberá someterse al ensayo completo.

Para efectuar este ensayo completo se mezclan en proporciones variables la sustancia problema y un combustible definido. Con cada una de las mezclas se forma una pila y ésta se enciende por un extremo. La velocidad máxima de combustión observada se compara con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Cualquier método de trituración y de mezcla que deba emplearse será válido siempre que la diferencia entre la velocidad máxima de combustión en los seis ensayos y la media aritmética no sobrepase el 10 %.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

1.6.1.1. *Sustancia problema*

Con el fin de obtener una granulometría inferior a 0,125 mm, se somete la muestra al siguiente procedimiento: se tamiza, se tritura la parte que quede y se tamiza de nuevo, repitiendo la operación hasta que toda la muestra haya pasado por el tamiz.

Para triturar y tamizar puede utilizarse cualquier método, siempre que se cumplan los criterios de calidad requeridos.

Antes de hacer la mezcla se desecará la muestra a 105 °C hasta obtener peso constante. Si la temperatura de descomposición de la sustancia es inferior a 105 °C, se secará a una temperatura inferior adecuada.

1.6.1.2. *Combustible*

El combustible es celulosa en polvo, del tipo utilizado en cromatografía en capa fina y en columna. Se considera adecuada una celulosa en la que la longitud de más del 85 % de las fibras esté comprendida entre 0,020 y 0,075 mm. El polvo de celulosa se tamiza con una malla de 0,125 mm. Hay que usar el mismo lote de celulosa en todo el ensayo.

Antes de preparar la mezcla, hay que secar la celulosa a 105 °C hasta obtener el peso constante.

Si en el ensayo preliminar se utiliza serrín, se elegirá un serrín de madera blanda, que se pasará por un tamiz de 1,6 mm de malla, se mezclará bien y se secará a 105 °C durante cuatro horas en capas de no más de 25 mm de espesor. Una vez enfriado, se debe guardar en un envase hermético, llenándolo lo más posible. Es preferible utilizar el serrín dentro de las 24 horas siguientes al secado.

1.6.1.3. *Fuente de ignición*

Debe utilizarse la llama fuerte de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm). Si se utiliza otra fuente de ignición (p. ej., si se hace el ensayo en atmósfera inerte) hay que dar su descripción y justificación.

1.6.2. **Desarrollo del ensayo**

Nota:

Las mezclas de comburante con celulosa o serrín deben considerarse potencialmente explosivas y tratarse con las debidas precauciones.

1.6.2.1. *Ensayo preliminar*

La sustancia secada se mezcla bien con celulosa o serrín seco, en una proporción en peso de 2 partes de sustancia problema por 1 parte de celulosa o serrín. Con la mezcla se forma una pila cónica de 3,5 cm de diámetro de base y 2,5 cm de altura, llenando sin comprimir un molde cónico (por ejemplo, un embudo de laboratorio de cristal con el vástago tapado).

La pila se coloca sobre una superficie fría, incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica. El ensayo debe realizarse bajo una campana extractora (véase el punto 1.6.2.2.).

La fuente de ignición se pone en contacto con el cono. Se observan y se anotan la intensidad y la duración de la reacción resultante.

Si la reacción es intensa, se considerará que la sustancia es comburante.

Cuando existan dudas respecto al resultado, será necesario efectuar el ensayo completo que se describe a continuación.

1.6.2.2. *Ensayo completo*

Se preparan mezclas de comburante y de celulosa que contengan de un 10 a un 90 % en peso de comburante, en incrementos del 10 %. Para los casos límite, hay que utilizar mezclas intermedias de comburante y celulosa para determinar la velocidad máxima de combustión con más precisión.

Se forma la pila con ayuda de un molde metálico de sección triangular de 250 mm de longitud, 10 mm de altura interior y 20 mm de anchura interior. A ambos lados de este molde se colocan en sentido longitudinal dos placas metálicas puestas como topes laterales que sobrepasen en 2 mm el borde superior de la sección triangular (figura). Este montaje se llena, sin apretar, con un ligero exceso de mezcla. Después de haber dejado caer una vez el molde desde una altura de 2 cm sobre una superficie dura, se elimina la materia sobrante por medio de una lámina sostenida oblicuamente. Se quitan entonces los topes laterales y se aplana la superficie del polvo con ayuda de un rodillo. Se pone entonces sobre el molde una placa incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica, se da la vuelta al conjunto y se quita el molde.

Se pone la pila en el tiro de una campana de gases.

Durante el ensayo, la velocidad de aspiración debe ser constante y suficiente para evitar que los humos se expandan por el laboratorio. Alrededor del aparato se coloca un cortaviento.

Dadas las propiedades higroscópicas de la celulosa y de algunas sustancias problema, el ensayo debe efectuarse lo más rápidamente posible.

Se enciende un extremo de la pila aplicándole la llama.

Se mide el tiempo de reacción sobre 200 mm después de que la zona de reacción haya recorrido una distancia inicial de 30 mm.

El ensayo se realiza con la sustancia de referencia y, por lo menos una vez, con cada una de las mezclas de sustancia problema con celulosa.

Si se observa una velocidad máxima de combustión significativamente mayor que la de la mezcla de referencia, puede detenerse el ensayo; si no es así, se repetirá de nuevo cinco veces con cada una de las tres mezclas que hayan dado las velocidades de combustión más elevadas.

Si se sospecha que el resultado es un falso positivo, hay que repetir el ensayo con una sustancia inerte que presente un tamaño de partícula similar, como el kieselguhr, en lugar de la celulosa. Otra posibilidad es someter a ensayo en atmósfera inerte (< 2 % v/v de oxígeno) la mezcla sustancia problema/celulosa que haya dado la mayor velocidad de combustión.

2. **RESULTADOS**

Por razones de seguridad, la velocidad máxima de combustión, en lugar de la media, será considerada como la propiedad comburante característica de la sustancia examinada.

En la evaluación se tendrá en cuenta la velocidad de combustión más elevada medida en una serie de seis ensayos con una mezcla dada.

Se representa gráficamente la velocidad de combustión más elevada de cada mezcla en función del contenido en comburante. La velocidad máxima de combustión se obtiene a partir de la gráfica.

Las seis velocidades de combustión medidas en una serie con la mezcla que haya dado la velocidad máxima de combustión, no deben diferir en más de 10 % de la media aritmética. En caso contrario, se deberán mejorar los métodos de trituración y mezcla.

Se compara la velocidad máxima de combustión obtenida con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia (véase punto 1.3).

Si se hacen ensayos en atmósfera inerte, se comparará la velocidad máxima de reacción con la de la mezcla de referencia en atmósfera inerte.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— identidad, composición, pureza, humedad, etc., de la sustancia problema,

— cualquier tratamiento a que se haya sometido la muestra (por ejemplo, triturado o secado),

— fuente de ignición utilizada en los ensayos,

— resultados de las medidas,

— tipo de reacción (por ejemplo: combustión rápida superficial, combustión en toda la masa, cualquier observación que se refiera a los productos de combustión, etc.),

— cualquier otra observación que resulte de utilidad para la interpretación de los resultados, incluida una descripción de la intensidad (llama, chispa, humo, combustión lenta sin llama, etc.) y la duración aproximada de la reacción observada durante el ensayo preliminar de seguridad/selección para la sustancia problema y la sustancia de referencia,

— resultado de los ensayos con una sustancia inerte, en su caso,

— resultado de los ensayos en atmósfera inerte, en su caso.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considerará que una sustancia es comburante si:

a) hay una reacción intensa en el ensayo preliminar;

b) durante el ensayo completo la velocidad máxima de combustión de las mezclas problema es superior o igual a la de la mezcla de referencia formada por celulosa y nitrato de bario.

A fin de evitar los falsos positivos, a la hora de interpretar los resultados también habrá que tener en cuenta los valores obtenidos al estudiar la sustancia problema mezclada con material inerte o en atmósfera inerte.

4. BIBLIOGRAFÍA

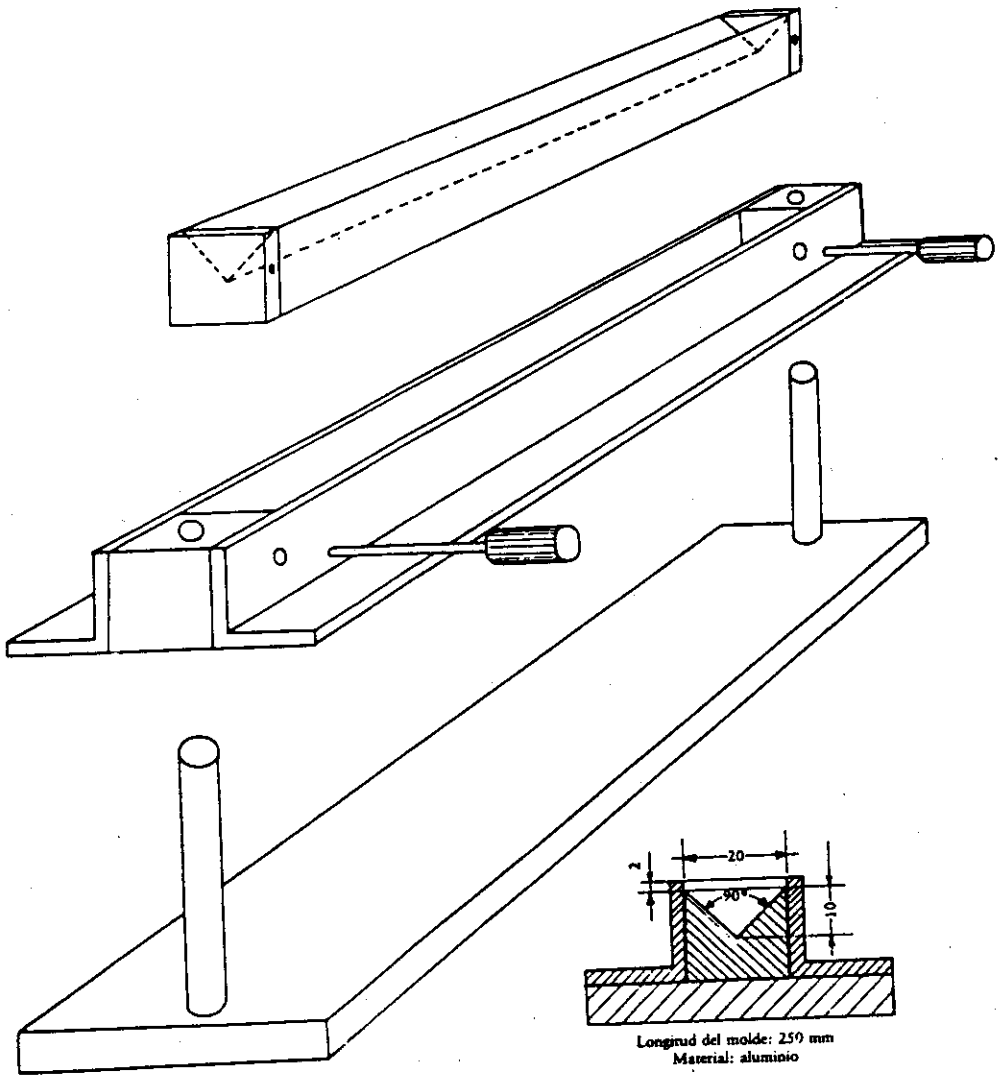
(1) NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Apéndice

Figura

Molde y accesorios necesarios para formar las pilas

(todas las dimensiones expresadas en milímetros)



Longitud del molde: 250 mm
Material: aluminio

PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE B

A. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general.

B. DEFINICIONES

(i) **La toxicidad aguda** incluye los efectos desfavorables que se manifiestan durante un período dado (habitualmente 14 días) después de la administración de una dosis única de una sustancia.

(ii) La DL_{50} (dosis letal media) es la dosis única que, estadísticamente, es la causa de la muerte del 50% de los animales a los que se les ha administrado la sustancia. El valor de la DL_{50} se expresa en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso de los animales sometidos al experimento (miligramos por kilo).

(iii) La CL_{50} (concentración letal media) es la concentración de una sustancia que, estadísticamente, es la causa —durante una exposición o, después de ésta, en un plazo definido — de la muerte del 50% de los animales expuestos a la misma durante un período determinado. El valor de la CL_{50} se expresa en peso de sustancia de ensayo por unidad de volumen de aire (miligramos por litro).

(iv) **El nivel sin efectos tóxicos** es la dosis o el nivel de exposición máximos utilizados en un ensayo que no produce signos detectables de toxicidad.

(v) **La toxicidad subaguda/subcrónica** incluye los efectos desfavorables que aparecen en los animales de laboratorio cuando reciben dosis diarias de una sustancia o cuando están expuestos diariamente a la misma durante un período de tiempo breve, en comparación con sus expectativas de vida.

(vi) **La dosis máxima tolerada** (DMT) es el nivel más alto de dosis que produce signos de toxicidad en animales sin alterar de forma importante la supervivencia en relación con la prueba en la que se usa.

(vii) **La irritación cutánea** es la producción de modificaciones cutáneas reversibles de naturaleza inflamatoria que aparecen después de la aplicación de una sustancia.

(viii) **La irritación ocular** es la producción de modificaciones oculares reversibles que aparecen después de la aplicación de la sustancia sobre la superficie anterior del ojo.

(ix) **La sensibilización de la piel** (dermatitis alérgica de contacto) es una reacción cutánea, de origen inmunológico, a una sustancia.

Definiciones específicas de la toxicidad por inhalación

— un aerosol se define como partículas (sólidas o líquidas) dispersas de forma homogénea en el aire

— el **diámetro aerodinámico** es el diámetro de una esfera de densidad uno (1 g cm^{-3}) que tenga la misma velocidad de sedimentación que la partícula en cuestión

— el **diámetro aerodinámico de la mediana de la masa** (DAMM) es el diámetro aerodinámico calculado que divide por dos la distribución en tamaño del aerosol al medirlo en masa

— la **desviación geométrica típica** (DGT) es el cociente entre el percentil 84 estimado y el percentil 50 estimado e indica la pendiente de la curva acumulativa de distribución del tamaño de las partículas, suponiendo que la distribución en tamaño es logarítmica normal.

Definiciones específicas para el procedimiento de la dosis fija en la determinación de toxicidad oral aguda

— **La toxicidad manifiesta** se refiere a los efectos tóxicos observados tras la administración de la sustancia que se estudie, que tienen una intensidad tal que el nivel de dosis inmediatamente superior podría provocar la muerte.

— **La dosis discriminante** es el nivel de dosis más elevado de los cuatro establecidos que se puede administrar sin que se produzca la muerte (incluyendo el sacrificio por motivos humanitarios).

C. MUTAGENICIDAD (incluidos los ensayos preexploratorios de carcinogenicidad)

Para la evaluación preliminar del potencial mutagénico de una sustancia es preciso disponer de información suficiente sobre dos efectos finales, a saber, la mutación génica y las aberraciones cromosómicas.

Estos dos tipos de efectos finales se evalúan por medio de los siguientes ensayos:

(i) ensayos basados en la aparición de mutaciones génicas (puntuales) en células procariotas tales como *Salmonella typhimurium*; se puede utilizar también *Escherichia coli*. La elección entre estos dos organismos puede venir determinada por la sustancia de ensayo;

(ii) ensayos basados en la producción de aberraciones cromosómicas en células de mamíferos cultivadas *in vitro*; también se puede operar *in vivo* (ensayo de micronúcleos o análisis de las células de la médula ósea en el estadio de la metafase). Sin embargo, en ausencia de alguna contraindicación los ensayos *in vitro* son mayormente preferidos.

D. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Existen límites para la extrapolación directa al hombre de los resultados obtenidos mediante la experimentación animal e *in vitro*; hay que tenerlo en cuenta al evaluar e interpretar los ensayos de toxicidad.

Si se dispone de ello, la evidencia de efectos adversos en los seres humanos pueden ser importantes a la hora de determinar los efectos potenciales de las sustancias químicas en la población humana.

E. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

La toxicología es una ciencia experimental en pleno progreso y existe bibliografía abundante sobre cada tema. En las líneas directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) se puede encontrar información.

Observaciones complementarias

Cuidado de los animales

Al proceder a experimentaciones toxicológicas, es esencial controlar rigurosamente las condiciones ambientales y utilizar técnicas de cuidados apropiadas para los animales.

(i) condiciones de alojamiento

Las condiciones ambientales de los locales o recintos donde se lleva a cabo la experimentación deben ser adecuadas para la especie que se utilice. Para ratas, ratones y cobayas, la temperatura del local debe ser de 22 ± 3 °C y la humedad relativa de 30 a 70%; para los conejos, la temperatura debe ser de 20 ± 3 °C y la humedad relativa de 30 a 70%.

Algunas técnicas experimentales son particularmente sensibles a los efectos de la temperatura; en tales casos, en la descripción del método se incluyen indicaciones detalladas sobre las condiciones idóneas. En todas las investigaciones sobre efectos tóxicos deben vigilarse y registrarse la temperatura y la humedad y consignar las medidas en el informe final del estudio.

Cuando se utilice alumbrado artificial, habrá que alternar, normalmente, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los datos relativos al programa de alumbrado deberán registrarse y consignarse en el informe final del estudio.

En los informes sobre las experiencias con animales es importante indicar el tipo de jaula utilizada así como el número de animales alojados en cada una, tanto durante la exposición a las sustancias químicas como durante el período de observación posterior.

(ii) Alimentación

El alimento debe responder a todas las exigencias nutricionales de la especie sometida a experimentación. Cuando se incorporan sustancias de ensayo al alimento de los animales, puede reducirse el valor nutritivo del alimento si se da una interacción entre la sustancia y los componentes de la comida.

Al interpretar los resultados del ensayo debe considerarse la posibilidad de una interacción de este tipo.

Las impurezas contenidas en la dieta alimenticia cuya influencia en la toxicidad esté probada, no deberán estar presentes en concentraciones que puedan interferir en el ensayo.

Bienestar de los animales

Se prestará la debida consideración al bienestar de los animales cuando se elaboren los métodos de ensayo. A continuación se dan algunos ejemplos brevemente, sin que la lista sea exhaustiva. Los términos exactos o las condiciones precisas se encontrarán en el texto de los métodos:

— Se introduce un método alternativo para la determinación de la toxicidad oral aguda, el «Procedimiento de Dosis Fija». En él no se utiliza la muerte como punto final específico. Se utilizan menos animales y se produce menos dolor y sufrimiento que en el caso de la determinación clásica de la toxicidad oral aguda.

— Se reduce el número de animales utilizados al mínimo científicamente aceptable: solamente se someten a ensayo 5 animales del mismo sexo por nivel de dosis en los métodos B.1 y B.3. Se utilizan solamente 10 animales (y solamente 5 para el grupo de control negativo) para la determinación de la sensibilización de la piel en el ensayo de maximización del conejillo de indias (método B.6). Se reduce también el número de animales que se necesitan para el control positivo cuando se estudia la mutagenicidad *in vivo* (métodos B.11 y B.12).

— Se reducen al mínimo el dolor y el sufrimiento de los animales durante los ensayos: puede ser preciso sacrificar a los animales que muestren signos intensos y continuados de dolor y sufrimiento; no será preciso realizar la dosificación de sustancias de manera que provoque intenso dolor y sufrimiento debido a las propiedades corrosivas o irritantes (métodos B.1, B.2 y B.3.).

— Se evita la realización de ensayos con dosis innecesariamente altas mediante la introducción de ensayos límite, no solamente en los ensayos de toxicidad aguda (métodos B.1, B.2 y B.3) sino también en los ensayos *in vivo* sobre mutagenesis (métodos B.11 y B.12).

— Una estrategia para examinar la irritación permite ahora no realizar un ensayo, o reducirlo a un estudio sobre un solo animal si se pueden proporcionar las suficientes evidencias científicas.

Dicha evidencia científica se puede basar en las propiedades físico-químicas de la sustancia, en los resultados de otros ensayos ya realizados o en los resultados de ensayos *in vitro* bien convalidados. Por ejemplo, si se ha llevado a cabo un estudio de toxicidad aguda con la sustancia por vía dérmica (método B. 3) a la dosis de ensayo límite sin que se haya observado irritación de la piel, pueden ser innecesarios ensayos ulteriores de irritación dérmica (método B.4); sustancias que hayan mostrado capacidad de corrosión evidente o grave irritación de la piel en un estudio de irritación dérmica (método B.4) no deben probarse posteriormente en cuanto a su capacidad de irritación ocular (método B.5).

PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE B

ESTUDIOS A LARGO PLAZO

Estudios subcrónicos, crónicos y de carcinogénesis

Caracterización de la sustancia en estudio y de la mezcla empleada para el tratamiento

Antes de iniciar cualquier estudio de toxicidad, es preciso conocer la composición de la sustancia objeto de estudio, incluidas las impurezas de importancia, y sus propiedades fisicoquímicas destacadas, como la estabilidad.

Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia estudiada aportan información importante para la selección de la vía de administración, el diseño de los estudios subcrónicos, crónicos o de carcinogénesis y la manipulación y el almacenamiento del material.

Asimismo, la información sobre la estructura química y las propiedades fisicoquímicas puede dar una idea de las características de absorción por la vía de administración propuesta, y de las posibilidades de distribución metabólica e histica. También es posible que se disponga de información sobre parámetros toxicocinéticos, procedente de estudios de toxicidad y toxicocinéticos previos.

El comienzo del estudio debe ir precedido del desarrollo de un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sustancia estudiada — incluidas las impurezas principales, si es posible — en el vehículo de administración y en el material biológico.

Animales de experimentación: selección de especie y cepa

Debido a la necesidad de tratar a los animales durante una parte importante de su existencia, los estudios suelen limitarse a especies fáciles de mantener y de vida relativamente corta. Es muy deseable el conocimiento de la incidencia de enfermedades y tumores espontáneos en la cepa utilizada cuando se mantienen condiciones similares.

Las cepas deben estar perfectamente caracterizadas y carecer de defectos congénitos perturbadores. El empleo de cepas consanguíneas, o híbridos F1, tiene ciertas ventajas a este respecto, pero si se dispone de datos suficientes sobre los antecedentes de cepas no consanguíneas, utilizando animales procedentes de colonias cerradas, puede recurrirse a ellas.

Cuidado de los animales, alimentación y bebida

Las pruebas y estudios con animales deben realizarse de acuerdo con la normativa nacional y tener en cuenta principios humanitarios y los últimos progresos en el campo de la protección animal.

Para obtener resultados significativos son imprescindibles un control estricto de las condiciones ambientales y unas técnicas adecuadas de manipulación de animales. Factores como el alojamiento, las enfermedades intercurrentes, la farmacoterapia, las impurezas en la alimentación, el aire, el agua y la cama, los cuidados generales de los animales y las instalaciones, pueden influir en gran medida en el resultado de estudios con dosis repetidas. En general, debe conocerse el efecto de los esterilizantes químicos en el estudio.

La alimentación debe satisfacer todas las necesidades nutritivas de la especie estudiada y carecer de impurezas que puedan influir en el resultado de la prueba. Los roedores recibirán alimentos y agua *ad libitum;* el alimento se cambiará al menos semanalmente. En la actualidad se utilizan tres tipos de alimentación: convencional, sintética y dietas diversas de fórmula libre.

Sea cual sea la alimentación elegida, los proveedores deben determinar, mediante controles periódicos, el valor nutritivo y el nivel de contaminantes de la alimentación básica, y facilitar la información así obtenida al laboratorio con cada lote de producto. Es muy conveniente el conocimiento de los efectos del régimen alimenticio sobre el metabolismo, así como sobre el desarrollo de tumores y la longevidad de los animales.

Además, el laboratorio que haga la prueba puede practicar un contraanálisis de la alimentación básica para controlar los componentes alimenticios y los contaminantes involuntarios, incluidos los agentes cancerígenos. Si se hace así, los resultados de los análisis han de conservarse e incluirse en el informe final sobre cada sustancia estudiada.

No deben estar presentes componentes habituales de la alimentación que se sabe influyen en la carcinogénesis (por ejemplo, antioxidantes, ácidos grasos insaturados, selenio) en concentraciones pertubadoras. La posible influencia de varios contaminantes alimenticios comunes en la evaluación de la cancerogenicidad obliga a prestar una atención especial a la presencia en la alimentación de residuos de plaguicidas, compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, estrógenos, metales pesados, nitrosaminas y micotoxinas.

Cuando la sustancia estudiada se administre en el agua o el alimento, son esenciales las pruebas de estabilidad. Han de practicarse pruebas de estabilidad y homogeneidad debidamente realizadas para establecer la frecuencia de preparación y control de la alimentación necesaria.

Si se esteriliza la alimentación, deben conocerse los efectos de las técnicas empleadas sobre la sustancia estudiada y sobre los componentes alimenticios. Se practicarán los ajustes que procedan.

Durante las pruebas de cancerogenicidad, los investigadores deben ser conscientes de la posible contaminación del agua empleada. El agua apta para el consumo humano es, por lo general, satisfactoria, y debe disponerse de información sobre su composición.

Es posible que, a medida que crezcan los animales, sea preciso ajustar la concentración de una sustancia estudiada en la alimentación para mantener una ingestión razonablemente constante de ella en relación con el peso corporal.

Ha de lograrse que los valores nutritivos de las alimentaciones de control y de prueba sean lo más parecidos posible. En consecuencia, hay que tener en cuenta el valor nutritivo de una sustancia de prueba incorporada a la alimentación. La experiencia indica que es improbable que una concentración de hasta un 5 % de sustancias de prueba no nutritivas en la alimentación, altere en grado significativo el valor nutritivo de ésta.

1. Estudios por inhalación

No se especifica prueba límite alguna, ya que no ha sido posible definir un valor de exposición límite por inhalación único.

2. Estudio de teratogenicidad

El metódo de prueba se basa fundamentalmente en la administración por vía oral. Es posible utilizar otras vías según las propiedades físicas de la sustancia objeto de estudio, o de la vía probable de exposición humana. En tales casos, el método de prueba debe adaptarse teniendo en cuenta la información obtenida de la prueba de 28 días.

3. Toxicocinética

Los estudios toxicocinéticos ayudan a interpretar y evaluar los datos de toxicidad. Estos estudios van encaminados a aclarar aspectos determinados de la toxicidad de la sustancia química objeto de estudio, y sus resultados pueden ayudar a idear estudios de toxicidad ulteriores. No se contempla la necesidad de determinar en cada caso todos los parámetros. Sólo en casos esporádicos será precisa la totalidad de los estudios toxicocinéticos (absorción, excreción, distribución y metabolismo). En el caso de compuestos determinados, tal vez sean oportunos cambios de la secuencia de los estudios, o baste un estudio de dosis única.

Definiciones

Toxicocinética:	Estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de sustancias de prueba.
Absorción:	Proceso o procesos por los que penetra en el organismo una sustancia administrada.
Excreción:	Proceso o procesos por los que se eliminan del organismo la sustancia administrada, sus metabolitos o ambos.
Distribución:	Proceso o procesos por los que la sustancia absorbida, sus metabolitos o ambos, se reparten por el interior del organismo.
Metabolismo:	Proceso o procesos por los que la sustancia administrada se modifica estructuralmente en el organismo por medio de reacciones enzimáticas o no enzimáticas.

4. Estudio agudo y subagudo en una segunda especie

El objeto de un estudio en una segunda especie es complementar las conclusiones extraídas en la primera.

Si se practica un estudio en una segunda especie, el método de prueba ya descrito puede utilizarse o adaptarse para un número menor de animales.

5. Estudios de fertilidad

Cuando sea necesaria una prueba de reproducción en tres generaciones, cabe ampliar el método descrito para la prueba de reproducción en dos generaciones, a fin de cubrir la tercera.

6. Estudios de mutagénesis

Pruebas de mutagénesis complementarias, incluidas pruebas de detección de la carcinogénesis

En el Anexo VIII de la Directiva se citan estudios complementarios para determinar la mutagénesis o la carcinogénesis. Los estudios descritos en esta sección pueden utilizarse en general para investigar ambas cosas.

Introducción

La evaluación inicial de la actividad mutágena de una sustancia comprende pruebas encaminadas a descubrir mutaciones génicas (puntuales) en las bacterias, así como lesiones citogenéticas en células de mamíferos *(in vitro* o *in vivo)*; se han descrito anteriormente métodos adecuados para estos estudios «de base». Esta sección se ocupa de estudios complementarios que permiten comprobar o ampliar los resultados obtenidos en las pruebas de base y que pueden emplearse con varios fines:

1. confirmar los resultados obtenidos en las pruebas de base;
2. investigar objetivos no perseguidos en aquéllas;
3. iniciar o ampliar estudios *in vivo*.

Con estos fines, la gama de pruebas descritas comprende sistemas eucariotas *in vitro* e *in vivo*, así como una amplia variedad de finalidades biológicas. Las pruebas aportan información sobre mutaciones puntuales en organismos más complejos que las bacterias empleadas en las pruebas de base y amplían la información sobre la capacidad de una sustancia para inducir aberraciones cromosómicas.

También se describen pruebas con finalidades distintas de las mutaciones puntuales y las aberraciones cromosómicas, que facilitan información complementaria y, si procede, pueden utilizarse en programas de experimentación.

Por norma general, si se considera la aplicación de un programa de estudios complementarios de mutagénesis, debe organizarse de forma que aporte información añadida pertinente sobre el potencial mutágeno o cancerígeno de la sustancia.

La elección de los estudios oportunos en un caso concreto dependerá de numerosos factores, como son las características químicas y físicas de la sustancia, los resultados de las pruebas bacterianas y citogenéticas iniciales, el perfil metabólico de la sustancia, los resultados de otros estudios de toxicidad y los usos conocidos de la sustancia. En consecuencia, y dada la diversidad de factores que deben tenerse en cuenta, no es oportuno un programa rígido de selección de las pruebas. No obstante, pueden servir de orientación ciertos principios generales. Así, cuando una de las pruebas de base haya sido positiva, los estudios complementarios deben incluir al menos una prueba capaz de descubrir la misma finalidad genética. Si las dos pruebas de base han dado resultado negativo, deben practicarse normalmente, como estudios complementarios, una prueba de mutaciones génicas y otra encaminada a descubrir aberraciones cromosómicas. Quizá sea apropiado obtener también datos complementarios de las pruebas indicadoras (antes enumeradas).

A continuación se agrupan los métodos empleados para tales investigaciones según su finalidad genética principal.

Estudios de investigación de mutaciones génicas (puntuales)

Para la investigación ulterior de la capacidad de una sustancia de producir mutaciones génicas (puntuales), pueden ser apropiadas cualquiera de las pruebas siguientes:

a) Estudios de mutación directa o inversa con microorganismos eucariotas *(Saccharomyces cerevisiae)*.

b) Estudios *in vitro* para descubrir mutaciones directas en células de mamífero.

c) Prueba del gen letal recesivo ligado al sexo en *Drosophila melanogaster*.

d) Prueba de mutación somática *in vivo*: prueba de la mancha en el ratón.

Estudios de investigación de aberraciones cromosómicas

Para la investigación ulterior de la capacidad de una sustancia de producir aberraciones cromosómicas, pueden ser apropiadas cualquiera de las pruebas siguientes:

a) Estudios citogenéticos *in vivo* en mamíferos.

Si no se ha incluido en la evaluación inicial (estudios de base), debe considerarse el uso del análisis *in vivo* de la metafase de células de la médula ósea. Además, puede estudiarse la citogenética de las células embrionarias *in vivo*.

b) Estudios citogenéticos *in vitro* de células de mamífero, si no se han incluido en la evaluación inicial.

c) Gen letal dominante en roedores.

d) Prueba de translocación hereditaria en el ratón.

Pruebas indicadoras de efectos en el DNA

Se dispone de métodos que indican determinados efectos en el DNA pero cuya finalidad no es una manifestación mutágena. Estos estudios pueden aportar información complementaria de la obtenida en los estudios de mutagénesis, y posiblemente útil para interpretar éstos. Si se precisaran estas investigaciones, puede ser apropiado cualquiera de los métodos siguientes, que emplean microorganismos eucariotas o células de mamífero:

a) Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.

b) Lesión y reparación del DNA — síntesis de DNA no programada — células de mamífero *(in vitro)*.

c) Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero *(in vitro)*.

Otras pruebas indicadoras de potencial carcinógeno

Hay disponibles ensayos de transformación de células de mamífero que determinan la capacidad de una sustancia para inducir en un cultivo celular alteraciones morfológicas y de comportamiento, que se consideran relacionadas con una transformación maligna *in vivo*. Pueden utilizarse varios tipos celulares y criterios de transformación diferentes.

Evaluación del riesgo de efectos hereditarios en mamíferos

Existen métodos para determinar los efectos hereditarios en mamíferos producidos por mutaciones génicas (puntuales) [prueba del locus específico en el ratón [1]] o por aberraciones cromosómicas (prueba de translocación hereditaria en el ratón). Estos métodos pueden emplearse cuando se valore el riesgo genético de una sustancia para el ser humano. No obstante, habida cuenta de la complejidad de estas pruebas y del enorme número de animales necesarios, sobre todo para la prueba del locus específico, estos estudios deben estar completamente justificados.

---

[1] La prueba del locus específico en el ratón (no descrita en este documento) puede usarse para determinar la mutación sufrida por células embrionarias en la primera generación tras exposición a una sustancia mutágena. Es posible apreciar y cuantificar las alteraciones genéticas generadoras de modificaciones de los productos génicos y expresadas en fenotipos visibles.

B.1. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIONES

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administran oralmente, mediante alimentación forzada, dosis crecientes de la sustancia de ensayo a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis por lote. Las dosis deben seleccionarse a partir de los resultados de una prueba de determinación del intervalo. Se observan a continuación los efectos y la mortalidad debidos a la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueren durante la prueba así como a los que sobreviven al final del experimento. Este método está esencialmente destinado a los estudios con roedores.

Los animales que muestren signos de dolor y angustia graves y duraderos deberá sacrificarse de forma humanitaria. No se administrarán sustancias de forma que produzcan dolor y angustia graves debido a sus propiedades corrosivas o irritantes.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. Preparaciones

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento por lo menos durante los 5 días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos y se reparten entre los diferentes lotes del experimento. Si es necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o se pone en suspensión en un vehículo adecuado. Se recomienda utilizar una solución acuosa siempre que sea posible; si no, se puede utilizar una solución en aceite vegetal y, eventualmente, una solución en otros vehículos o una suspensión. En lo que se refiere a los vehículos no acuosos, debe conocerse o determinarse su toxicidad antes o durante el ensayo. Normalmente, en lo que se refiere a los roedores, el volumen no debe sobrepasar los 10 ml/kg de peso corporal, salvo que sean soluciones acuosas, de las que se pueden utilizar hasta 20 ml/kg. La variabilidad del volumen de ensayo debe minimizarse ajustando la concentración, de forma que se garantice un volumen constante para todas las dosis estudiadas.

1.6.2. Condiciones experimentales

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

La especie preferida es la rata, salvo indicación contraria.

Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, al comienzo del ensayo, la diferencia de peso entre los animales utilizados no debe exceder de ± 20% del valor medio apropiado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Para cada dosis se utilizarán al menos 5 roedores. Todos serán del mismo sexo. Si se utilizan hembras, deberán ser nulíparas y no grávidas. Cuando se disponga de información que demuestre que uno de los sexos es mucho más sensible, se usarán animales de ese sexo para el ensayo.

Nota: Se tomará en consideración utilizar un número menor de animales en los ensayos de toxicidad aguda, si se trata de animales de un orden superior al de los roedores.

Se seleccionarán cuidadosamente las dosis y se hará todo lo posible para no sobrepasar dosis moderadamente tóxicas. Se evitará en estos ensayos la administración de dosis letales de la sustancia.

1.6.2.3. *Dosis*

Las dosis deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten variedad de efectos tóxicos y de tasas de mortalidad. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva dosis/respuesta y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la DL_{50}.

1.6.2.4. *Pruebas límite*

Cuando se usen roedores, se realizará una prueba límite, con dosificación única de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal, en un grupo de 5 machos y 5 hembras, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Si hay mortalidad debida a la sustancia, habrá que considerar la realización de un estudio completo.

1.6.2.5. *Período de observación*

El período de observación debe ser por lo menos de 14 días. No obstante, su extensión no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse en función de las reacciones de toxicidad, de su velocidad de aparición y de la duración del período de recuperación; por lo tanto, en caso de necesidad puede prolongarse. Es importante el momento en el que aparecen y en el que desaparecen los síntomas de toxicidad, así como el momento de la muerte, sobre todo si en la sustancia se observa una tendencia a causar una muerte retardada.

1.6.3. **Procedimiento**

Los animales deben estar en ayunas antes de que se les administre la sustancia. En el caso de la rata, se le debe retirar el alimento desde la víspera de la administración de la sustancia; para los animales que tienen un metabolismo más rápido es conveniente acortar el período de ayuno; el agua no será racionada. Al día siguiente, se deben pesar los animales antes de la administración de la sustancia de ensayo mediante ingestión forzada de una dosis única. Si no es posible administrar la sustancia en una dosis única, se administrará en fracciones más pequeñas durante un período no superior a 24 horas. Después de administrarles la sustancia, se puede todavía dejar sin alimento a los animales durante 3 o 4 horas. Si la dosis se administra en fracciones repartidas a lo largo de cierto lapso de tiempo, puede resultar necesario dar alimento y agua a los animales en función de la duración del tratamiento.

Una vez se haya administrado la sustancia, las observaciones se efectuarán y registrarán de forma sistemática, abriendo una ficha individual para cada animal. El primer día, las observaciones deben efectuarse con frecuencia.

Deberá hacerse un examen clínico cuidadoso al menos una vez cada día laborable. Diariamente se harán otras observaciones, actuando de forma que se reduzca la pérdida de animales en el estudio, por ejemplo, mediante autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos. La observación diaria debe concentrarse en las modificaciones de la piel y del pelo, de los ojos, de las mucosas, del aparato respiratorio, del sistema circulatorio, de los sistemas nerviosos autónomo y central, de la actividad somato-motriz y del comportamiento. Deben observarse con especial atención los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe registrarse con la mayor precisión posible.

Se hará la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrarse todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán tejidos para su examen histopatológico.

Valoración de la toxicidad en el otro sexo

Tras completar el estudio en uno de los sexos, se hará un estudio mediante administración de la sustancia, al menos, en un grupo de 5 animales del sexo contrario, de forma que quede establecido que los animales de este sexo no son mucho más sensibles a la sustancia de ensayo. En circunstancias particulares podrá justificarse el uso de menor número de animales. Cuando se disponga de información adecuada que demuestre que los animales del sexo sometido a ensayo son mucho más sensibles, podrá prescindirse del ensayo en animales del otro sexo.

2. **RESULTADOS**

Los datos deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote del ensayo, el número de animales al principio del ensayo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presentan otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. El peso de cada animal debe determinarse y registrarse poco tiempo antes de la administración de la sustancia y, después, una vez por semana y en el momento de la muerte. Las variaciones de peso deben calcularse y registrarse cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales sacrificados de forma humanitaria por angustia y dolor debidos a la sustancia se registrarán como muertos debidos a la sustancia. La DL_{50} puede determinarse mediante un método reconocido. La evaluación de los resultados debe incluir la posible relación que exista entre la exposición de los animales a la sustancia de ensayo y la incidencia y gravedad de todas las anomalías, incluidas las anomalías clínicas y de comportamiento, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos.

3. **INFORME**

3.1. Informe del ensayo

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.

— condiciones del ensayo,

— dosis (indicando las concentraciones y, en su caso, el vehículo),

— sexo de los animales utilizados,

— cuadro de los datos de respuestas por sexo y por dosis (número de animales muertos o sacrificados durante el ensayo, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte después de la administración de la dosis, razones y criterios usados para el sacrificio humanitario de los animales,

— todo tipo de observaciones,

— valor de la DL_{50} para el sexo sometido al ensayo completo, determinada el decimocuarto día (indicando con precisión el método de cálculo),

— intervalo de confianza estadística del 95 % para la DL_{50} (cuando pueda conseguirse),

— curva dosis/mortalidad y pendiente de esta curva (cuando el método de cálculo lo permita),

— observaciones de la autopsia,

— toda observación histopatológica,

— resultado de todas las pruebas en el sexo contrario,

— discusión de los resultados (debe prestarse especial atención al efecto que puede tener sobre el valor calculado de la DL_{50} el sacrificio de animales durante el ensayo),

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase introducción general de la parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.1 bis. TOXICIDAD AGUDA (ORAL) — MÉTODO DE DOSIS FIJA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase introducción general, Parte B (A).

1.2. DEFINICIONES

Véase introducción general, Parte B (B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El ensayo de toxicidad oral aguda proporciona información sobre los efectos adversos que pueden acaecer, en un breve período de tiempo, como consecuencia de la ingestión de una única dosis de la sustancia que se estudia.

El método de dosis fija se lleva a cabo en dos fases.

En un estudio preliminar, se investigan de manera secuencial los efectos de varias dosis administradas por vía oral a animales individuales de un solo sexo. El estudio preliminar proporciona información acerca de la relación entre dosis y toxicidad, así como una estimación de la dosis letal mínima. No se suelen utilizar más de 5 animales en esta primera fase.

En el estudio principal, se administra la sustancia por vía oral a grupos de 5 machos y 5 hembras, a uno de los niveles de dosis preestablecidos (5, 50, 500 o 2 000 mg/kg). Se utiliza una dosis determinada mediante el estudio preliminar; será la dosis proclive a producir una «toxicidad manifiesta» (véase 1.2 Definiciones), pero ninguna muerte.

Una vez administrada la sustancia, se realizan observaciones sobre sus efectos.

En caso de que la dosis inicial elegida produzca una toxicidad manifiesta pero no la muerte, no será preciso realizar otras pruebas.

En caso de que el nivel de dosis elegido no produzca toxicidad manifiesta, se deberá volver a administrar la sustancia al nivel de dosis inmediatamente superior. Si los animales mueren, o si es preciso sacrificarlos debido a una fuerte reacción tóxica en los mismos, se deberá volver a administrar la sustancia al nivel de dosis inmediatamente inferior.

Este procedimiento permite la identificación de la «dosis discriminante» (véase 1.2 Definiciones), que es la mayor de las dosis preestablecidas que se puede administrar sin que provoque la muerte (incluyendo el sacrificio de los animales).

Es posible que se deban sacrificar los animales que muestren signos intensos y constantes de sufrimiento y dolor. No se deberían llevar a cabo pruebas en las que se utilicen dosis de la sustancia que se sabe que provocan sufrimiento y dolor intensos debido a las propiedades corrosivas o irritantes de dicha sustancia.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ESTUDIO

1.6.1. Preparación

1.6.1.1. *Animales de experimentación*

A no ser que existan contraindicaciones, la especie preferida será la rata.

Se deberán emplear tipos de ratas habitualmente utilizados en laboratorio. Al principio de la prueba, la amplitud de la variación del peso para cada sexo de los animales utilizados no debería sobrepasar ± 20 % del valor medio pertinente.

Se mantiene a los animales bajo condiciones experimentales de vida y de alimentación durante un período mínimo de cinco días antes de la realización del ensayo. Se eligen al azar animales jóvenes y sanos antes del ensayo y son asignados a los grupos de tratamiento del estudio preliminar y del estudio principal. En la práctica, sin embargo, se puede utilizar un solo grupo de cada sexo en el estudio principal.

1.6.1.2. *Preparación y administración de la dosis*

Si es necesario, se disuelve o se suspende la sustancia en cuestión en un vehículo apropiado. Se recomienda que, si es posible, se considere en primer lugar la utilización de una solución acuosa, a continuación una solución de aceite vegetal, después una posible solución en otros vehículos, o la suspensión. En el caso de los vehículos no acuosos, se deberían conocer las características tóxicas propias del vehículo, o se deberían determinar antes o durante la realización del ensayo. En los roedores, el volumen no debería sobrepasar 10 ml/kg del peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, en las que se pueden usar 20 ml/kg. Se debería reducir a un mínimo la variación en el volumen de las sustancias mediante el ajuste de la concentración, con el fin de asegurar que se utiliza un volumen constante en todos los niveles de dosis.

Se suprimirá la alimentación de los animales antes de la administración de la sustancia. En el caso de la rata, se deberá suprimir la alimentación la noche anterior; sin embargo, no se le suprimirá el agua. Se pesará a los animales al día siguiente y se les administrará en ese momento la sustancia mediante alimentación forzada en una única dosis. Si no es posible administrar una única dosis, se podrá dividir la dosis en pequeñas partes en un período que no sobrepase las 24 horas. Una vez se ha administrado la sustancia, se podrá suprimir la alimentación durante tres o cuatro horas más. Si se administra la dosis en pequeñas partes a lo largo de un cierto período podrá ser necesario dar comida y bebida a los animales, en función de la duración de dicho período.

1.6.2. Procedimiento

1.6.2.1. *Estudio preliminar*

Se estudia los efectos de varias dosis sobre animales individuales. En ausencia de indicaciones sobre una mayor sensibilidad de los machos, se utilizarán hembras. La dosificación es secuencial, con un mínimo de 24 horas antes de administrar la dosis a otro animal. Se observará cuidadosamente cada animal para detectar signos de toxicidad, durante un período de por lo menos 7 días; en caso que persistan signos de toxicidad moderada después de 7 días, se deberá prolongar la observación por otro período de 7 días. Se pueden considerar los niveles de dosis inicial siguientes: 5, 50, 500 y 2 000 mg/kg. Si la dosis inicial escogida no produce toxicidad grave, será necesario investigar uno o varios niveles de dosis intermedias. De esta manera, debe ser posible conseguir información sobre el nivel (los niveles) de dosis que produce(n) algunos signos de toxicidad y el nivel de dosis mínimo que produce mortalidad.

Se debería intentar seleccionar la dosis inicial usando evidencia procedente de sustancias relacionadas. En ausencia de dicha información, se sugiere utilizar en primer lugar la dosis de 500 mg/kg. En caso de no manifestarse ningun signo de toxicidad con la dosis inicial, se investigará la dosis inmediatamente superior. Si no se produce ninguna mortalidad a la dosis de 2 000 mg/kg, el estudio preliminar se da por terminado y se efectúa el estudio principal a esa misma dosis. Si se manifiestan efectos graves, requiriendo el sacrificio de los animales, a la dosis inicial (por ejemplo 500 mg/kg), se administrará la dosis inmediatamente inferior a otro animal. Si este animal sobrevive, se podrán administrar los niveles de dosis intermedios entre las dosis fijas a otros animales. Normalmente, no se debería usar más de 5 animales en este procedimiento.

1.6.2.2. *Estudio principal*

Se deberían utilizar un mínimo de 10 animales (5 hembras y 5 machos) para cada nivel de dosis que se investiga. Las hembras deberán ser nulíparas y no deberán estar preñadas.

Un principio del método de dosis fija es que sólo se utilizan dosis moderadamente tóxicas. Se debería evitar la administración de dosis letales de la sustancia.

El nivel de dosis que se utilizará en la prueba se debería seleccionar a partir de uno de los cuatro niveles de dosis fija, es decir, 5, 50, 500 o 2 000 mg/kg del peso corporal. El nivel de dosis inicialmente elegido deberá ser aquel que produzca toxicidad manifiesta pero no la muerte (incluyendo el sacrificio de los animales; las muertes

accidentales no están incluidas pero se deberían registrar). No se deberán realizar más ensayos cuando el nivel de dosis en cuestión produzca toxicidad manifiesta pero no la muerte.

En los casos en los que la administración del nivel de dosis elegido no provoque toxicidad manifiesta, se deberá volver a realizar un ensayo con la sustancia al nivel de dosis inmediatamente superior. Sin embargo, se deberá continuar la observación de los animales hasta que finalice el período de observación. En caso en que una fuerte reacción tóxica haga preciso el sacrificio de los animales, o si los animales mueren a consecuencia del compuesto, se deberá realizar un nuevo ensayo con la sustancia al nivel de dosis inmediatamente inferior. Una vez más, los animales que no se deban sacrificar se mantendrán bajo observación durante todo el período de observación.

Una vez administrada la sustancia, se realizarán observaciones y se registrarán sistemáticamente. Se deberán realizar registros individuales para cada animal.

El período de observación será de un mínimo de 14 días. Sin embargo, no se debería fijar rígidamente la duración de la observación. Se determinará mediante las reacciones tóxicas, la velocidad de su aparición y la duración del periodo de recuperación. Así pues, se podrá ampliar cuando se considere necesario. Es importante conocer el momento en el que aparecen y desaparecen los signos de toxicidad, así como el momento de la muerte, especialmente si existe una tendencia al retraso en la aparición de signos de toxicidad.

Se deberá realizar un minucioso examen clínico un mínimo de dos veces al día de la dosificación y un mínimo de una vez al día los días siguientes. Se deberán sacrificar los animales que manifiesten dolor o intensos signos de sufrimiento. Será preciso realizar observaciones adicionales durante los primeros días tras la dosificación si los animales continúan mostrando signos de toxicidad. Se podrá dar por concluido el ensayo si se comprueba que el nivel de dosis inicialmente elegido era demasiado elevado.

Las observaciones deberían incluir los cambios en la piel , ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Se deberá prestar especial atención a los temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño y coma.

Se deberá determinar el peso de cada animal inmediatamente antes de que se administre la sustancia, de forma diaria los tres días siguientes y de forma semanal con posterioridad. Se pesarán y se realizarán necropsias a los animales que mueran durante la realización del ensayo y a los que sobrevivan a la finalización del mismo. Se deberán registrar todos los grandes cambios patológicos. Si así se indica, se deberán extraer tejidos para realizar exámenes histopatológicos.

Podrá ser necesario realizar una investigación de un segundo o, en casos excepcionales, de un tercer nivel de dosis, lo que estará en función de los resultados del nivel de dosis anterior.

En caso de que una sustancia produzca la muerte con una dosis de 5 mg/kg del peso corporal (o cuando un estudio de determinación de la gama de valores indique que ese nivel de dosis provocará la muerte) podrá ser necesario seguir investigando la toxicidad aguda de la sustancia.

2. RESULTADOS

Se deberán resumir los resultados (tanto los del estudio preliminar como los del estudio principal) en forma de tabla en la que se muestre el número de animales existentes al iniciar el ensayo para cada nivel de dosis, el número de animales que muestren signos de toxicidad, el número de animales que hayan muerto durante el ensayo o hayan sido sacrificados, una descripción de los efectos tóxicos y, para el estudio principal, si se observó la existencia de toxicidad manifiesta relacionada con el compuesto, la evolución en el tiempo de los efectos tóxicos y la información que proporcionen las necropsias. Se deberán calcular y registrar los cambios de peso cuando los animales sobrevivan más de un día.

Los animales que se sacrifiquen debido al dolor y sufrimiento relacionado con el compuesto se registrarán como muertes provocadas por el compuesto.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información, considerando tanto el estudio preliminar como el estudio principal:

— especie, tipo, origen, condiciones medioambientales, dieta, etc.

— condiciones en que se realiza el ensayo

— niveles de dosis (con el vehículo, si se utilizó, y la concentración)

— resultados completos de todos los niveles de dosis investigados

— tabulación de la información sobre la respuesta por sexo y nivel de dosis (por ejemplo, número de animales utilizado; cambios en el peso corporal; número de animales que murieron o fueron sacrificados durante el ensayo, si se da el caso; número de animales que mostraron signos de toxicidad; naturaleza, intensidad y duración de los efectos)

— evolución en el tiempo de la aparición de signos de toxicidad y si éstos eran reversibles

— en el caso de que los animales murieran o fueran sacrificados, lapso de tiempo entre la muerte y la dosificación, razones y criterios utilizados para el sacrificio por razones humanitarias de los animales

— resultados de las necropsias

— resultados de los exámenes histopatológicos

— discusión de los resultados

— interpretación de los resultados, incluidos los signos de toxicidad manifiesta y el nivel de la dosis discriminante identificada en el ensayo.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

DOSIS	RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
5 mg/kg de peso corporal	Supervivencia de menos del 100 %	Compuestos que son MUY TÓXICOS
	Supervivencia del 100 %, pero toxicidad manifiesta	Compuestos que son TÓXICOS.
	Supervivencia del 100 %, sin toxicidad manifiesta	Véanse los resultados con 50 mg/kg
50 mg/kg de peso corporal	Supervivencia de menos del 100 %	Compuestos que pueden ser TÓXICOS o MUY TÓXICOS. Véanse los resultados para 5 mg/kg
	Supervivencia del 100 %, pero toxicidad manifiesta	Compuestos que son NOCIVOS
	Supervivencia del 100 %, sin toxicidad manifiesta	Véanse los resultados para 500 mg/kg
500 mg/kg de peso corporal	Supervivencia de menos del 100 %	Compuestos que pueden ser TÓXICOS o NOCIVOS. Véanse los resultados para 50 mg/kg
	Supervivencia del 100 %, pero toxicidad manifiesta	Compuestos que se considera que no tienen toxicidad aguda significativa
	Supervivencia del 100 %, sin toxicidad manifiesta	Véanse los resultados para 2 000 mg/kg
2 000 mg/kg de peso corporal	Supervivencia de menos del 100 %	Véanse los resultados para 500 mg/kg
	Supervivencia del 100 %, con o sin toxicidad manifiesta	Compuestos que no tienen una toxicidad aguda significativa

Véase introducción general, Parte B (D).

4. REFERENCIAS

Véase introduccion general, Parte B (E).

El punto 1.6.2.4, "prueba límite", del método B.2, "toxicidad aguda (inhalación) "será sustituido por el texto siguiente:

"1.6.2.4. Prueba límite

Si una exposición de cinco machos y cinco hembras a una concentración de 20 mg. por litro de un gas o 5 mg. por litro de un aerosol o de partículas durante cuatro horas (o, si ello no fuera posible debido a las propiedades físicas o químicas, incluso explosivas, de la sustancia de prueba, a la concentración máxima posible) no causa la muerte de ningún animal en 14 días, se podrá considerar innecesaria la prosecución del experimento".

B.2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es útil disponer de información preliminar sobre la distribución del tamaño de partícula, la presión de vapor, el punto de fusión, el punto de ebullición, el punto de inflamación y la detonabilidad (si procede) de la sustancia.

Véase también la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIONES

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen varios lotes de animales de laboratorio a la sustancia de ensayo a concentraciones diferentes durante un período determinado, utilizándose una sola concentración por lote. Se observan a continuación los efectos y la mortalidad debidos a la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueran durante el experimento así como, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido.

Los animales que muestren signos de angustia y dolor graves y duraderos deberán sacrificarse de forma humanitaria. No se administrarán sustancias que produzcan dolor y angustia graves debido a sus propiedades corrosivas o irritantes.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento por lo menos durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes sanos y se reparten entre los diferentes lotes del experimento. No es necesario someterlos a una exposición simulada, a menos que lo exija el dispositivo de exposición utilizado.

Puede ser necesario micronizar las sustancias sólidas para conseguir partículas del tamaño adecuado.

Si es preciso, se puede añadir la sustancia a un vehículo adecuado para obtener una concentración apropiada de aquélla en la atmósfera, en cuyo caso se utilizará un grupo testigo para dicho vehículo. Si para facilitar la dosificación se utiliza un vehículo u otros aditivos, no deberán producir efectos tóxicos. Pueden utilizarse resultados disponibles ya comprobados, siempre que sean apropiados.

1.6.2. Condiciones del ensayo

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Salvo indicación contraria, la rata es la especie idónea. Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso al comienzo de la prueba entre los animales utilizados en el ensayo no debe exceder de ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Para cada nivel de concentración se utilizarán al menos diez roedores (5 hembras y 5 machos). Las hembras deberán ser nulíparas y no grávidas.

Nota: Se considerará la posibilidad de utilizar un número menor de animales cuando se realicen ensayos de toxicidad aguda con animales de un orden superior al de los roedores. Las dosis se seleccionarán cuidadosamente y se hará todo lo posible por no sobrepasar dosis moderadamente tóxicas. Se evitará en esos ensayos la administración de dosis letales de la sustancia de ensayo.

1.6.2.3. *Concentraciones de exposición*

Las concentraciones deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten variedad de efectos tóxicos y de tasas de mortalidad. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva concentración/mortalidad y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la CL_{50}.

1.6.2.4. *Prueba límite*

Si la exposición durante 4 horas de 5 machos y 5 hembras a la concentración de 5 miligramos por litro de un gas o de un aerosol de sustancias líquidas o sólidas o — si ello no fuera posible debido a las propiedades químicas o físicas, incluso explosivas, de la sustancia — a la concentración máxima posible no causa la muerte de ningún animal dentro de los 14 días siguientes, no será necesario continuar el experimento.

1.6.2.5. *Duración de la exposición*

La duración de la exposición debe ser de 4 horas.

1.6.2.6. *Equipo experimental*

Los animales deben exponerse a la sustancia por medio de un dispositivo de inhalación que produzca un flujo dinámico de, por lo menos, 12 renovaciones de aire por hora, para garantizar un contenido de oxígeno suficiente y la distribución uniforme del producto de ensayo en la atmósfera. Si se utiliza una cámara, debe estar concebida de forma que se evite, en lo posible, el amontonamiento de los animales y que su exposición máxima por inhalación de la sustancia quede asegurada. Por regla general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera, el «volumen» total de animales de laboratorio no debe sobrepasar el 5 % del volumen de la cámara de ensayo. También se puede recurrir a un sistema de exposición oro-nasal, únicamente de cabeza o de cuerpo entero, en una cámara individual; con los dos primeros tipos de exposición se evita la absorción de la sustancia por otras vías.

1.6.2.7. *Período de observación*

El período de observación debe ser por lo menos de 14 días. No obstante, su extensión no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse en función de las reacciones de toxicidad, de su velocidad de aparición y de la duración del período de recuperación; por lo tanto, en caso de necesidad puede prolongarse. Son importantes el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad, así como el momento de la muerte, sobre todo si en la sustancia se observa una tendencia a causar una muerte retardada.

1.6.3. **Procedimiento**

Poco tiempo antes de la exposición, se pesan los animales y, a continuación, se exponen a la concentración de ensayo en el equipo descrito, durante 4 horas, una vez que se haya estabilizado la concentración en la cámara. La estabilización debe ser rápida. La temperatura durante el ensayo debe mantenerse a 22 ± 3 °C. Lo ideal sería mantener la humedad relativa entre el 30 y el 70 % pero en ciertos casos (por ejemplo, en la prueba de algunos aerosoles) esto puede resultar imposible. El mantener una ligera presión negativa dentro de la cámara (<; 5 mm de agua) evitará la dispersión de la sustancia de ensayo en la zona circundante. Se privará de alimento y de agua a los animales durante la exposición. Se utilizarán sistemas apropiados para crear y controlar la atmósfera de ensayo. El sistema debe permitir crear condiciones de exposición estables lo más rápidamente posible. La cámara se diseñará y funcionará de forma que se mantenga en su interior una distribución homogénea de la atmósfera del ensayo.

Es conveniente medir o vigilar:

(a) el caudal de aire (permanentemente);

(b) la concentración real de la sustancia de ensayo en la zona de respiración, al menos tres veces durante la exposición (algunas atmósferas, p. ej., aerosoles a altas concentraciones, necesitarán una vigilancia más frecuente). Durante el período de exposición, la concentración no debe variar en más de ± 15 % respecto al valor medio. Sin embargo, en el caso de ciertos aerosoles puede ser difícil conseguir este control, en cuyo caso se puede aceptar una diferencia mayor. En los aerosoles, debe analizarse el tamaño de las partículas tan a menudo como sea necesario (al menos una vez por grupo de ensayo);

(c) temperatura y humedad, si es posible continuamente;

Las observaciones tienen lugar durante y después de la exposición y se registran sistemáticamente; debe abrirse una ficha individual para cada animal. El primer día deben efectuarse con frecuencia las observaciones. Deberá hacerse un examen clínico cuidadoso al menos cada día laborable. Diariamente se harán otras observaciones complementarias actuando de manera que se reduzca la pérdida de animales para el estudio, por ejemplo, mediante autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos.

La observación incluirá las modificaciones de la piel y del pelo, los ojos, las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención la respiración, los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe registrarse con la mayor precisión posible. El peso de cada animal deberá determinarse semanalmente después de la exposición, así como en el momento de la muerte. Se hará la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrarse, especialmente, las modificaciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, anotando todos los cambios patológicos importantes. Si es necesario, se extraerán tejidos para un examen histopatológico.

2. **RESULTADOS**

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada grupo de ensayo, el número de animales al principio del mismo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. Las variaciones de peso deben calcularse y registrarse cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales sacrificados por razones humanitarias debido a angustia o dolor producidos por la sustancia se registrarán como muertes debidas a la sustancia. La CL_{50} debe determinarse mediante un método reconocido. La evaluación de los resultados debe incluir la posible relación que existe entre la exposición de los animales a la sustancia y la incidencia y gravedad de todas las anomalías, incluidas las anomalías clínicas y de comportamiento, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.;

— condiciones del ensayo: Descripción del dispositivo de exposición, incluidos su concepción, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema generador de aerosoles, método de acondicionamiento del aire y, en su caso, método de alojamiento de los animales en la cámara de ensayo. Debe describirse el equipo utilizado para medir la temperatura y la humedad, así como la concentración de los aerosoles y la granulometría de las partículas.

Datos relativos a la exposición

Deben presentarse en forma de tabla, indicando los valores medios así como una medida de la variabilidad (por ejemplo desviación típica); a ser posible, deben incluir;

(a) el caudal de aire a través del dispositivo de inhalación,

(b) temperatura y humedad del aire,

(c) concentraciones nominales (cantidad total de sustancia de ensayo introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire),

(d) en su caso, naturaleza del vehículo,

(e) concentraciones reales en la zona de respiración,

(f) el diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) y la desviación geométrica típica (DGT),

(g) duración de la estabilización,

(h) duración de la exposición,

— tabla de reacciones, por sexo y por nivel de exposición (número de animales que mueren o se sacrifican durante el ensayo, número de animales que presentan síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte, durante o después de la exposición, motivos y criterios para el sacrificio humanitario de los animales,

— observaciones de cualquier tipo,

— valor de la CL_{50} para cada sexo, determinado al final del período de observación (indicando con precisión el método de cálculo utilizado),

— intervalo de confianza estadística del 95 % para la CL_{50} (si es posible determinarlo),

— curva concentración/mortalidad y pendiente de la curva (si el método de cálculo lo permite),

— resultados de las autopsias,

— toda observación histopatológica,

— discusión de los resultados (prestando especial atención al efecto que pueda tener sobre el valor calculado de CL_{50} el sacrificio humanitario de animales durante el ensayo,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.3. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIONES

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administran dosis diferentes de la sustancia de ensayo por aplicación cutánea a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis por lote. Se observan a continuación los efectos y la mortalidad causados por la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueran durante el ensayo así como al final de ésta, a los que hayan sobrevivido.

Los animales que muestren signos de dolor y angustia graves y duraderos deberán sacrificarse de forma humanitaria. No se administrarán sustancias que produzcan dolor y angustia graves debido a sus propiedades corrosivas o irritantes.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las jaulas para el experimento en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el ensayo por lo menos durante los 5 días anteriores. Antes de comenzar el ensayo se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos y se reparten entre los diferentes lotes del ensayo. Unas veinticuatro horas antes del ensayo se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal del tronco de los animales, evitando cualquier lesión de la piel que pueda modificar su permeabilidad. La superficie que hay que preparar para la aplicación de la sustancia no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Cuando se sometan a ensayo sólidos, que puedan pulverizarse eventualmente, la sustancia deberá humedecerse con agua o, si es preciso, con un vehículo adecuado, para asegurar un buen contacto con la piel. Si se utiliza un vehículo, se habrá de tener en cuenta su incidencia sobre la penetración de la sustancia en la piel. Las sustancias líquidas, generalmente, se aplican sin diluir.

1.6.2. Condiciones del ensayo

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Se pueden utilizar ratas o conejos adultos. Se pueden utilizar igualmente otras especies pero, en tal caso, hay que justificar su utilización. Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso al comienzo del ensayo entre los animales utilizados no debe exceder de ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Para cada dosis se utilizarán al menos 5 animales del mismo sexo. Si se utilizan hembras, deberán ser nulíparas y no grávidas. Cuando se disponga de información que demuestre que un sexo es mucho más sensible, se utilizarán para la prueba animales de ese sexo.

Nota: Se considerará la posibilidad de utilizar un número menor de animales cuando se realicen ensayos de toxicidad aguda con animales de un orden superior al de los roedores. Las dosis se seleccionarán cuidadosamente y se hará todo lo posible por no sobrepasar dosis moderadamente tóxicas. Se evitará en esos ensayos la administración de dosis letales de la sustancia de estudio.

1.6.2.3. *Dosis*

Las dosis deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten variedad de efectos tóxicos y de mortalidad. Al elegir las dosis debe tomarse en consideración cualquier efecto irritante o corrosivo. Los resultados deben ser sufcientes para que se pueda trazar una curva dosis/respuesta y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la DL_{50}.

1.6.2.4. *Prueba límite*

Puede realizarse un ensayo límite, con dosificación única de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal, en un grupo de 5 machos y 5 hembras, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Si hay mortalidad debida a la sustancia, habrá que considerar la realización de un estudio completo.

1.6.2.5. *Período de observación*

El período de observación debe ser de, al menos, 14 días. Sin embargo, su extensión no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse en función de las reacciones de toxicidad, su velocidad de aparición y la duración del período de curación; por lo tanto, puede prolongarse en caso de necesidad. Es importante el momento en el que aparecen y en el que desaparecen los síntomas de toxicidad, así como el momento de la muerte, sobre todo si se observa en la sustancia una tendencia a causar una muerte retardada.

1.6.3. **Procedimiento**

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. La sustancia debe aplicarse sobre una superficie equivalente al 10 % de la superficie total del cuerpo. En el caso de sustancias altamente tóxicas la superficie puede ser menor, pero procurando que en toda la superficie la sustancia forme una película lo más fina y uniforme posible.

Las sustancias de ensayo deben mantenerse en contacto con la piel por medio de un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante durante 24 horas. Además, la parte tratada debe estar convenientemente cubierta para mantener en su lugar el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Se pueden utilizar aparatos de contención para impedir que los animales ingieran la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa.

Al término del período de aplicación de la sustancia de ensayo, ésta deberá eliminarse, a ser posible, con agua o con otro procedimiento adecuado de limpieza de la piel.

Las observaciones se registrarán sistemáticamente a medida que se efectúen, abriendo una ficha individual para cada animal. El primer día las observaciones deben efectuarse con frecuencia. Deberá hacerse un examen clínico atento al menos cada día laborable. Diariamente deberán hacerse otras observaciones actuando de manera que se reduzca el número de animales perdidos para el estudio, por ejemplo mediante autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos.

Las observaciones deben incluir las modificaciones del pelo, la piel tratada, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe anotarse con la mayor precisión posible. Se hará la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrare todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán tejidos para un examen histopatológico posterior.

Valoración de la toxicidad en el otro sexo

Tras completar el estudio en uno de los sexos, se hará un estudio con al menos un grupo de 5 animales del sexo contrario, de forma que quede establecido que los animales de este sexo no son mucho más sensibles a la sustancia de ensayo. En circunstancias particulares podrá justificarse el uso de menor número de animales. Cuando se disponga de información adecuada que demuestre que los animales del sexo sometido a prueba son mucho más sensibles, podrá prescindirse del ensayo en animales del otro sexo.

2. RESULTADOS

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote, el número de animales al principio del ensayo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. El peso de cada animal debe determinarse y anotarse poco antes de la aplicación de la sustancia y, después de la misma, una vez por semana y en el momento de su muerte; deben calcularse y registrarse las variaciones de peso cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales que se sacrifiquen de forma humanitaria debido a angustia o dolor causados por la sustancia se registrarán como muertes debidas a la sustancia. La DL_{50} debe determinarse mediante un método reconocido.

La evaluación de los resultados debe incluir la eventual relación que exista entre la exposición de los animales a la sustancia y la incidencia y gravedad de todas las anomalías, incluidas las anomalías clínicas y del comportamiento, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.;
— condiciones de ensayo (incluido el procedimiento de limpieza de la piel y el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),
— dosis (indicando las concentraciones y, en su caso, el vehículo),
— sexo de los animales utilizados,
— tabla de respuestas por sexo y por dosis (número de animales que mueren o son sacrificados durante el ensayo, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),
— momento de la muerte después de administrar la dosis, motivos y criterios para el sacrificio humanitario de los animales,
— todas las observaciones,
— valor de la DL_{50} para el sexo sometido a un estudio completo, determinado el decimocuarto día, indicando con precisión el método de cálculo,
— intervalo de confianza estadística del 95 % para la DL_{50} (si es posible determinarlo),
— curva dosis/mortalidad y pendiente de la curva si el método de cálculo lo permite,
— resultados de la autopsia,
— observaciones histopatológicas,
— resultado de cualquier ensayo en el sexo contrario,
— discusión de los resultados (prestando especial atención al efecto que puede tener sobre la DL_{50} calculada el sacrificio humanitario de animales durante el ensayo),
— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.4. TOXICIDAD AGUDA (IRRITACIÓN DE LA PIEL)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Consideraciones iniciales

Se procurará tener en cuenta escrupulosamente toda información disponible sobre una sustancia para reducir al mínimo los ensayos de sustancias en condiciones que, probablemente, vayan a producir reacciones graves. La siguiente información puede ser útil cuando se sopese si es adecuado realizar un ensayo completo, un estudio en un animal único o no realizar más ensayos:

i) Propiedades fisicoquímicas y reactividad química. Las sustancias que sean ácidos o bases fuertes (pH demostrado igual o inferior a 2 o igual o superior a 11,5, por ejemplo) no necesitarán pruebas de irritación dérmica primaria si son de esperar propiedades corrosivas. Debe tenerse también en cuenta la reserva ácida o básica.

ii) Si se dispone de evidencia convincente de efectos graves en pruebas *in vitro* validadas, no será necesario hacer una prueba completa.

iii) Resultados de estudios de toxicidad aguda. Si se ha realizado una prueba de toxicidad aguda por vía cutánea a la dosis de sustancia de la prueba límite (2 000 mg/kg de peso corporal) y no se ha observado irritación de la piel, será innecesario realizar más pruebas de irritación dérmica. Además, es innecesario someter a prueba materiales que hayan mostrado toxicidad elevada por vía cutánea.

Se aplica la sustancia de ensayo, en una dosis única, sobre la piel de varios animales de laboratorio, siendo cada uno de ellos su propio testigo. Se observa la importancia de la reacción de irritación y se valora después de un lapso de tiempo determinado; se hará una descripción detallada con el fin de permitir una evaluación completa de los efectos. El período de observación debe ser suficientemente largo para poder evaluar completamente el carácter reversible de los efectos observados.

Los animales que muestren signos graves y duraderos de angustia o dolor deberán ser sacrificados de forma humanitaria.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Unas veinticuatro horas antes del ensayo se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal del tronco del animal.

Al hacer esta operación hay que tener cuidado de no arañar la piel. Sólo deben utilizarse animales que tengan una piel sana e intacta.

Algunas cepas de conejo tienen islotes de pelo denso que son más prominentes en ciertas épocas del año. No se aplicarán las sustancias de ensayo en esas zonas de crecimiento denso.

Si se someten a ensayo sustancias sólidas (que, si es necesario, se pueden pulverizar) deben humedecerse suficientemente con agua o, si es preciso, con un vehículo adecuado, para garantizar un buen contacto con la piel. En este último caso, hay que tener en cuenta la incidencia del vehículo en la irritación cutánea provocada por la sustancia de ensayo. Las sustancias líquidas se aplican generalmente sin diluir.

1.6.2. Condiciones del ensayo

1.6.2.1: *Animales de laboratorio*

Aunque pueden utilizarse varias especies de mamíferos, la especie idónea es el conejo albino.

1.6.2.2. *Número de animales*

Si se sospecha, por resultados preliminares *in vitro* u otras razones, que la sustancia podría producir necrosis (ej. corrosiva) debe pensarse en un ensayo con animal único. Si los resultados de este ensayo no indican corrosividad, se completará el mismo usando al menos dos animales más.

Para el ensayo completo, se utilizarán por lo menos tres animales sanos adultos. No es necesario utilizar animales separados para disponer de un grupo de control no tratado. Puede resultar necesaria la utilización de un número mayor para precisar las respuestas dudosas.

1.6.2.3. *Dosis*

Salvo indicación contraria, se aplicará en el lugar elegido un volumen de 0,5 ml de líquido o 0,5 g de sustancia sólida o semisólida. En cada animal, las zonas de piel adyacente no tratada sirven de testigo.

1.6.2.4. *Período de observación*

La duración del período de observación no debe fijarse de forma rígida y debe ser suficiente para poder evaluar por completo el carácter reversible o irreversible de los efectos observados, aunque normalmente no debe superar los 14 días a partir de la administración.

1.6.3. Procedimiento

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. La sustancia debe aplicarse sobre una pequeña superficie de piel (unos 6 cm^2) y cubrirse con un apósito de gasa, mantenido en su lugar con un esparadrapo no irritante. En el caso de líquidos o de algunas pastas puede resultar necesario extender en primer lugar la sustancia sobre una gasa y después aplicar ésta sobre la piel; la gasa debe mantenerse en contacto con la piel, sin apretar, por medio de un apósito oclusivo o semioclusivo apropiado durante todo el período de exposición. Hay que impedir que el animal alcance la gasa y que ingiera o inhale la sustancia.

Al final del período de exposición debe eliminarse la sustancia, a ser posible, con agua o con un disolvente apropiado, teniendo cuidado de no modificar ni la respuesta producida ni la integridad de la epidermis.

La duración de la exposición suele ser de 4 horas.

Si se sospecha que la sustancia puede producir necrosis (ej. corrosiva) deberá reducirse la duración de la exposición (por ejemplo, 1 hora o 3 minutos). Este ensayo puede hacerse también utilizando en primera instancia un único animal y, si no queda excluido por la toxicidad dérmica aguda de la sustancia de ensayo, pueden aplicarse simultáneamente a ese animal tres apósitos. El primero se retira a los tres minutos. Si no hay reacción cutánea grave, se retira el segundo al cabo de una hora. Si las observaciones en este punto aconsejan una exposición de cuatro horas y ésta puede hacerse humanitariamente, se retira el tercer apósito a las cuatro

horas, graduando las respuestas obtenidas. En este caso (es decir, si ha sido posible una exposición de cuatro horas), se completará el ensayo utilizando al menos otros dos animales, salvo que no se considere humanitario hacerlo (por ejemplo, si se observa necrosis tras la exposición de cuatro horas).

Si se observa une reacción grave de la piel (p. ej. necrosis) al cabo de tres minutos o de una hora, se terminará inmediatamente el ensayo.

En ciertas condiciones pueden indicarse exposiciones más largas, por ejemplo, según los modos de utilización y de exposición previstos en el hombre.

1.6.3.1. *Observación y graduación*

Debe observarse la aparición de manifestaciones eritematosas y edematosas y graduar la respuesta a los 60 minutos y a las 24, 48 y 72 horas de haber levantado el apósito. Las reacciones de irritación se registran y gradúan según la tabla 1. Pueden resultar también necesarias otras observaciones si no se ha demostrado claramente la reversibilidad de las lesiones en las primeras 72 h. Además de estas observaciones sobre la irritación, deberá describirse completamente cualquier lesión grave, como la corrosión (destrucción irreversible del tejido de la piel) o cualquier otro efecto tóxico.

Pueden utilizarse técnicas como el estudio histopatológico o la medida del espesor del pliegue cutáneo para aclarar reacciones o respuestas dudosas enmascaradas por la tinción de la piel por la sustancia de ensayo.

2. RESULTADOS

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada animal, la graduación del eritema y del edema durante todo el período de observación. También deberá registrarse cualquier lesión grave, una descripción de la intensidad y naturaleza de la irritación, reversibilidad o corrosión y cualquier otro efecto tóxico que se observe.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.,

— condiciones de ensayo (incluidas las propiedades fisicoquímicas de la sustancia que sean oportunas, la técnica de preparación y limpieza de la piel y el tipo de apósito: oclusivo o semioclusivo),

— tabla de resultados de la reacción de irritación en cada animal y en cada momento de observación (por ejemplo, 1, 24, 48 y 72 horas, etc., después de levantar el apósito),

— descripción de cualquier lesión grave observada, incluida la corrosión,

— descripción de la intensidad y naturaleza de la irritación observada y cualquier observación histopatológica,

— descripción de cualquier efecto tóxico distinto a la irritación cutánea,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

Apéndice

TABLA: GRADUACIÓN DE LA REACCIÓN CUTÁNEA

Eritema y formación de escaras

	Valor
Sin eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (color rojo violáceo) o formación de escaras que impiden leer el eritema (lesión en profundidad)	4

Formación de edema

Sin edema	0
Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
Edema ligero (contorno de la zona edematosa bien definido por una elevación neta)	2
Edema moderado (elevación de aproximadamente 1 mm)	3
Edema grave (elevación de más de 1 mm que se extiende más allá de la región expuesta)	4

B.5. TOXICIDAD AGUDA (IRRITACIÓN OCULAR)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Consideraciones iniciales

Se procurará tener en cuenta escrupulosamente toda información disponible sobre una sustancia para reducir al mínimo las pruebas de sustancias en condiciones que, probablemente, vayan a producir reacciones graves. Puede ser útil a este respecto disponer de la siguiente información:

i) Propiedades fisicoquímicas y reactividad química. Las sustancias que sean ácidos o bases fuertes (pH en el ojo demostrado igual o inferior a 2 o igual o superior a 11,5, por ejemplo) no necesitarán someterse a prueba si son de esperar lesiones graves. Debe tenerse también en cuenta la reserva ácida o básica.

ii) Resultados de estudios alternativos validados. Las sustancias que hayan mostrado propiedades potencialmente corrosivas o gravemente irritantes no tienen que someterse a la prueba de irritación ocular, ya que se supone que estas sustancias producirían efectos graves en los ojos si se siguiera este método.

iii) Resultados de estudios de irritación de la piel. Las sustancias que hayan mostrado claras propiedades corrosivas o hayan producido irritación grave de la piel en un estudio de irritación de la misma no tienen que someterse al ensayo de irritación ocular, ya que se supone que estas sustancias pueden producir efectos graves en los ojos.

Se aplica la sustancia de ensayo, en una dosis única, a un ojo de cada uno de varios animales de laboratorio; el ojo no tratado se utiliza como testigo. Se observa la importancia de la reacción de irritación y se valora a intervalos determinados; se hará una descripción detallada con el fin de permitir una evaluación completa de los efectos. El período de observación debe ser suficientemente largo para poder evaluar completamente el carácter reversible o irreversible de los efectos observados.

Los animales que muestren signos graves y duraderos de angustia o dolor deberán ser sacrificados de forma humanitaria.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Deben examinarse los dos ojos de cada animal seleccionado provisionalmente para el ensayo durante las 24 horas que preceden al mismo. No se utilizarán aquellos animales en los que se observe irritación ocular, defectos oculares o una lesión de cornea ya existente.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Aunque se hayan utilizado otros animales diferentes, se recomienda efectuar el ensayo en conejos albinos adultos y sanos.

1.6.2.2. *Número de animales*

Se considerará la posibilidad de hacer un ensayo en un único animal, si se prevén efectos graves. Si el resultado de este ensayo en un conejo sugiere que la sustancia es gravemente irritante (efecto reversible) o corrosiva (efecto irreversible) para el ojo utilizando el procedimiento descrito, puede no ser necesario realizar ensayos adicionales de irritación ocular en otros animales. En ocasiones, puede ser adecuado hacer ensayos en animales adicionales para investigar aspectos específicos.

Cuando no se utilice un único animal, se utilizarán por lo menos tres animales. Puede resultar necesario utilizar un mayor número de animales para precisar las respuestas dudosas.

1.6.2.3. *Dosis*

Si la sustancia de ensayo es un líquido, se utiliza un volumen de 0,1 ml. En cuanto a las sustancias sólidas, pastosas y en forma de partículas, la cantidad que se utilice debe tener un volumen de 0,1 ml o pesar alrededor de 0,1 g (siempre debe anotarse el peso). Si la sustancia de ensayo es sólida o granulosa debe ser triturada en polvo fino. La medida del volumen de las sustancias en forma de partículas debe ir precedida de una compresión ligera, por ejemplo, dando golpecitos al recipiente de medida.

Para las sustancias contenidas en pulverizadores o en recipientes de aerosoles a presión, debe expelerse el líquido y recoger y depositar 0,1 ml en el ojo, como se describe en el caso de los líquidos.

1.6.2.4. *Período de observación*

La duración del período de observación no debe fijarse de forma rígida y debe ser suficiente para poder evaluar el carácter reversible o irreversible de los efectos observados, aunque normalmente no debe superar los 21 días, a contar desde la instilación.

1.6.3. **Procedimiento**

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. La sustancia de ensayo debe instilarse en el saco conjuntival de uno de los ojos de cada animal, después de haber separado delicadamente el párpado inferior del globo ocular, y a continuación se juntan los párpados con cuidado durante un segundo más o menos para evitar que la sustancia salga. El otro ojo que no se trata sirve de testigo.

Si se piensa que la sustancia puede producir un dolor desproporcionado, se usará un anestésico local antes de la instilación de la sustancia de ensayo. El tipo, concentración y tiempo de aplicación del anestésico local deben seleccionarse cuidadosamente para garantizar que su uso no produzca diferencias significativas en la reacción a la sustancia de prueba. Debe anestesiarse de forma similar el ojo testigo.

No deben lavarse los ojos de los animales durante las 24 horas siguientes a la instilación de la sustancia de ensayo. Si es necesario, puede hacerse un lavado al final de dicho período.

Puede estar indicado realizar ensayos adicionales con conejos a los que se les hace un lavado de ojos poco tiempo después de la instilación de la sustancia, en el caso de aquellas sustancias que hayan demostrado su carácter irritante en el ensayo citado anteriormente. En estos casos, se recomienda utilizar 3 conejos. Medio minuto después de la instilación, los ojos de los conejos se lavan durante medio minuto, utilizando un volumen y una velocidad de salida del líquido que no produzca lesiones.

1.6.3.1. *Observación y graduación*

Los ojos deben examinarse después de 1, 24, 48 y 72 horas. Si no hay evidencia de lesiones oculares al cabo de 72 horas, se puede poner fin al ensayo.

Puede resultar necesario una observación prolongada en caso de daños persistentes en la córnea o de cualquier otra irritación ocular con el fin de determinar la evolución de las lesiones y su carácter reversible o irreversible. Además de las observaciones relativas a la córnea, al iris y a la conjuntiva, es conveniente registrar y describir todas las lesiones que se observen. La valoración de la reacción ocular (véase la tabla) debe registrarse en cada examen. (La valoración de las reacciones oculares puede dar lugar a diversas interpretaciones; como ayuda, los laboratorios de investigación y las personas encargadas de efectuar o de interpretar las observaciones, pueden recurrir a una guía ilustrada que trate de las irritaciones oculares.)

Para facilitar el examen de las reacciones, se puede utilizar una lupa binocular, una lámpara manual de hendidura, un biomicroscopio u otro instrumento adecuado. Después de registrar las observaciones efectuadas al cabo de 24 horas, puede proseguirse el examen de los ojos de algunos conejos o de todos ellos por medio de fluoresceina.

2. RESULTADOS

Los resultados deben inventariarse en un cuadro que recoja, para cada animal, los índices de irritación en el momento de cada observación. Hay que indicar una descripción del grado y naturaleza de la irritación, la presencia de lesiones graves y cualquier otro efecto no ocular que se observe.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— datos sobre los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.,

— condiciones del ensayo (incluidas las propiedades fisicoquímicas de la sustancia que sean oportunas),

— tabla de resultados de la reacción de irritación o corrosión en cada animal y en cada momento de observación (por ejemplo, 1, 24, 48 y 72 horas),

— descripción de cualquier lesión grave observada,

— descripción narrativa del grado y naturaleza de la irritación o la corrosión observadas, incluidas la zona de córnea afectada y su reversibilidad,

— descripción del método utilizado para graduar la irritación después de 1, 24, 48 y 72 horas (por ejemplo, lámpara manual de hendidura, biomicroscopio, fluoresceína),

— descripción de cualquier efecto local no ocular que se observe,

— discusión de los resultados.

— interpretación de los resultados,

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

Apéndice

TABLA: GRADUACIÓN DE LAS LESIONES OCULARES

Córnea

Opacidad: grado de densidad (las observaciones se efectuarán en las zonas más densas)

Sin ulceración ni opacidad	0
Zonas de opacidad (distintas a un ligero empañamiento del brillo normal) dispersas o difusas, detalles del iris netamente visibles	1
Zona traslúcida fácilmente discernible, detalles del iris ligeramente oscurecidos	2
Zona nacarada, detalles del iris completamente invisibles, tamaño de la pupila apenas discernible	3
Córnea opaca, iris no discernible a través de la opacidad	4

Iris

Normal	0
Pliegues netamente más profundos, congestión, tumefacción, hiperemia pericorneal moderada o conjuntiva inyectada, cualquiera de estos síntomas o cualquier combinación de varios de ellos, el iris continúa reaccionando a la luz (una reacción lenta es positiva)	1
Ausencia de reacción a la luz, hemorragia, destrucción marcada (cualquiera de los síntomas o todos ellos en conjunto)	2

Conjuntiva

Enrojecimiento (se aplica a la parte más afectada de las conjuntivas palpebral y ocular, en relación con el ojo de control)

Vasos sanguíneos normales	0
Neta hiperemia de algunos vasos sanguíneos (ojos inyectados)	1
Coloración carmesí difusa, vasos sanguíneos individuales difícilmente discernibles	2
Coloración roja fuerte y difusa	3

Quemosis: párpados o membranas nictitantes

Sin tumefacción	0
Cualquier tumefacción superior a la normal (incluidas las membranas nictitantes)	1
Tumefacción evidente con eversión parcial de los párpados	2
Tumefacción con párpados medio cerrados	3
Tumefacción con párpados casi cerrados	4

B.6. SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Observaciones:

La sensibilidad y capacidad de los ensayos para detectar sustancias potencialmente sensibilizantes de la piel humana se consideran importantes en un sistema de clasificación de la toxicidad aplicable a la salud pública.

No hay un método único que detecte todas las sustancias con potencial de sensibilización de la piel humana y que sea adecuado para todas las sustancias.

Para seleccionar un ensayo deben tenerse en cuenta factores como las características físicas de una sustancia, incluyendo en ellas la capacidad de penetración de la piel.

Los ensayos que utilizan cobayas pueden subdividirse en ensayos con adyuvante, en las que se potencia un estado alérgico disolviendo o suspendiendo la sustancia de ensayo en adyuvante completo de Freunds (FCA), y en ensayos sin adyuvante.

Es posible que los ensayos con adyuvantes sean más exactas, a la hora de predecir el efecto sensibilizante que una sustancia puede tener en la piel humana, que los métodos que no utilizan FCA; son, pues, los métodos preferidos.

El ensayo de maxilización en cobayas (GPMT) es un ensayo con adyuvante ampliamente utilizado. Aunque se pueden utilizar algunos otros métodos para detectar el potencial sensibilizante de una sustancia, se considera a la GPMT como la técnica con adyuvante de preferencia.

Los ensayos sin adyuvantes (suele utilizarse sobre todo el ensayo de Buehler) se consideran menos sensibles con muchas clases de químicos.

En ciertos casos, puede haber buenas razones para escoger el ensayo de Buehler, que implica una aplicación tópica, antes que la inyección intradérmica utilizada en la GPMT. Cuando se use el ensayo de Buehler habrá que justificarlo desde el punto de vista científico.

Se describen en este método el ensayo de maximización en cobayas (GPMT) y el ensayo de Buehler. Se pueden utilizar otros métodos siempre que estén bien validados y que se dé su justificación científica.

Independientemente del método que se utilice, debe controlarse a intervalos regulares (seis meses) la sensibilidad de la cepa de cobayas utilizada para probar la sensibilización de la piel; para ello se usarán un sensibilizante conocido, suave y moderado, y deberá obtenerse un número satisfactorio de respuestas positivas.

Véase también la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la, parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Se recomiendan las sustancias siguientes, diluidas como sea necesario, así como cualquier otra sustancia activa sensibilizadora, conocida en la bibliografía, ó que pertenezca al grupo de la sustancia que se estudia.

— p-fenilendiamina	nº CAS 106-50-3
— 2,4-dinitroclorobenceno	nº CAS 97-00-7
— dicromato potásico	nº CAS 7778-50-9
— sulfato de neomicina	nº CAS 1405-10-3
— sulfato de níquel	nº CAS 7786-81-4

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Después de una exposición inicial a la sustancia de ensayo (período de inducción) se somete a los animales, aproximadamente dos semanas después de la última exposición de inducción, a una exposición de provocación a la sustancia con el fin de establecer si se ha inducido un estado de hipersensibilidad. La sensibilización se determina examinando la respuesta cutánea a la exposición de provocación.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Prueba de maximización en cobayas (GPMT)

1.6.1.1. *Preparación*

Se eligen al azar cobayas albinos jóvenes y sanos y se reparten en lotes tratados y lotes testigo. Antes de administrar la sustancia, se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal superior procurando no dañar la piel.

1.6.1.2. *Condiciones del ensayo*

1.6.1.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albino, con peso individual inferior a 500 g.

1.6.1.2.2. Número y sexo

Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Se utilizan por lo menos 10 animales para el lote tratado y 5, por lo menos, para el lote testigo. Si se utiliza un número menor de animales, se debe explicar la razón. Si se obtienen resultados dudosos, se decidirá si se repite el ensayo con otro lote de animales, según el examen histopatológico. Cuando no sea posible concluir definitivamente si la sustancia es o no es sensibilizante, se recomienda utilizar animales adicionales, hasta llegar, al menos, a un total de 20 animales con la sustancia de ensayo y 10 animales control.

1.6.1.2.3. Dosis

La concentración de la sustancia se ajusta a un nivel que produzca cierta evidencia de irritación de la piel pero que los animales puedan tolerar bien en cada fase de inducción.

La concentración de provocación será la máxima que no induzca irritación cutánea alguna en los animales no sensibilizados.

Estas concentraciones pueden determinarse mediante un estudio preliminar reducido (2 ó 3 animales).

1.6.1.2.4. Período de observación

Durante el período de inducción, se observa la piel para controlar los posibles efectos irritantes. Después de la exposición de provocación, se registran las reacciones cutáneas, 24 y 48 horas después de quitar el apósito.

1.6.1.3. *Procedimiento*

Se pesan los animales antes de empezar y al terminar el ensayo. Se rasura el pelo de la región dorsal superior. El procedimiento consta de dos fases:

1.6.1.3.1. Inducción

Día 0 — grupo tratado

Las inyecciones intradérmicas, cada una de 0,1 ml, que a continuación se indican se ponen por pares en el dorso superior, de forma que una de las inyecciones del par se sitúe a un lado de la línea media y la otra en el opuesto:

Inyección 1:	0,1 ml de adyuvante completo de Freunds (FCA) mezclado con agua o suero fisiológico 1:1,
Inyección 2:	0,1 ml de sustancia de ensayo, en un vehículo adecuado, si fuera necesario:
Inyección 3:	0,1 ml de sustancia de ensayo en FCA.

En la inyección 3, las sustancias hidrosolubles se disuelven en 0,05 ml de agua y 0,05 ml de FCA no diluido. Si se ensayan sustancias liposolubles o insolubles, se mezclan con FCA no diluido.

En la inyección 3, la concentración final de la sustancia de ensayo será igual que la de la inyección 2.

Las inyecciones 1 y 2 se hacen próximas una de la otra y lo más cerca posible de la cabeza, mientras que la inyección 3 se sitúa hacia la parte caudal de la superficie de ensayo.

Día 0 — lote testigo

Las inyecciones intradérmicas siguientes se ponen por pares en los mismos lugares citados:

Inyección 1:	0,1 ml de FCA mezclado con agua o suero fisiológico 1:1
Inyección 2:	0,1 ml de vehículo solo;
Inyección 3:	0,1 ml de vehículo en FCA.

Sexto día — lotes tratados y testigo

Si la sustancia no es irritante para la piel, se pincela la zona de ensayo, tras esquilarla y/o rasurarla, con 0,5 ml de laurilsulfato sódico al 10 % en vaselina, para crear irritación local.

Séptimo día — lote tratado

Se elimina de nuevo el pelo de la zona de ensayo. Por medio de un vehículo adecuado se vierte la sustancia (debe justificarse la elección del vehículo; los sólidos, pulverizados finamente, se incorporan a un vehículo adecuado; los líquidos se pueden aplicar directamente) sobre un papel de filtro (2 × 4 cm) que se aplica sobre la superficie de ensayo y se mantiene en contacto con la zona de ensayo mediante un apósito oclusivo durante 48 horas.

Séptimo día — lote testigo

Se elimina de nuevo el pelo de la zona de ensayo. Se aplica sólo el vehículo, sobre la zona de ensayo, según el mismo método, y se mantiene en contacto con la piel mediante un vendaje oclusivo durante 48 horas.

1.6.1.3.2. Provocación

Vigésimo primer día

Se elimina el pelo de los costados de los animales tratados y de los testigos. Se aplica un apósito o una cámara con sustancia de ensayo sobre un costado de los animales tratados, mientras que en el otro costado se les aplica un apósito o una cámara únicamente con vehículo.

Los apósitos se mantienen en contacto con la piel mediante un vendaje oclusivo durante 24 horas.

Se somete el grupo testigo a la misma manipulación.

Vigésimo tercer y vigésimo cuarto días

— 21 horas después de haber levantado el apósito se limpia de pelo si fuera necesario la superficie sometida a ensayo,

— 3 horas más tarde (48 horas después de comenzar la aplicación de provocación) se observa y registra la reacción cutánea,

— 24 horas después de esta observación, se procede a una segunda observación (72 horas) que se registra.

Para precisar los resultados obtenidos en esta primera fase de provocación, se puede programar una segunda, si fuera necesario con un nuevo grupo testigo para el vehículo, más o menos una semana después de la primera fase.

1.6.1.3.3. Observaciones y graduación

Todas las reacciones cutáneas y todas las observaciones no habituales que se deriven de las fases de inducción y de provocación deben registrarse y consignarse en el informe.

Pueden utilizarse técnicas como el estudio histopatológico o la medida del espesor del pliegue cutáneo para aclarar reacciones o respuestas dudosas, enmascaradas por la tinción de la piel por la sustancia de ensayo.

1.6.2. Ensayo de Buehler

1.6.2.1. *Preparativos*

Se eligen al azar cobayas albinos jóvenes y sanos y se reparten en lotes tratados y lotes testigo. Antes de administrar la sustancia, se esquila y/o se rasura el pelo de un costado, procurando no dañar la piel.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

1.6.2.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas de cobayas albinos usadas corrientemente en laboratorios, con peso individual menor de 500 g.

1.6.2.2.2. Número y sexo

Pueden usarse animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deberán ser nulíparas y no grávidas. Se usarán al menos 20 animales en el lote tratado y al menos 10 en el lote testigo. Si se utiliza un número menor de animales, deberá explicarse la razón. Si se obtienen resultados dudosos, se decidirá si se repite el ensayo, con otro lote de animales, según el examen histopatológico.

1.6.2.2.3. Dosis

La concentración de la sustancia de ensayo, en cada fase de inducción se ajusta al nivel máximo que tenga buena tolerancia sistémica y que, en cuanto a las sustancias irritantes, produzca irritación moderada o leve en la mayoría de los animales de ensayo. La concentración de provocación será la máxima que no produzca señales de irritación cutánea en animales no sensibilizados. Estas concentraciones pueden determinarse mediante un estudio preliminar reducido (2 ó 3 animales).

1.6.2.2.4. Período de observación

Durante el período de inducción, se observa la piel para controlar los efectos irritantes. Después de la exposición de provocación, se registran las reacciones cutáneas 24 y 48 horas después de quitar el apósito, es decir, 30 y 54 horas después del comienzo de la aplicación.

1.6.2.3. *Procedimiento*

Se pesan los animales antes de empezar y al terminar el ensayo.

El procedimiento consta de dos fases:

1.6.2.3.1. Inducción

Día 0 — lote tratado

Se elimina el pelo de un costado. Por medio de un vehículo adecuado (debe justificarse la elección del vehículo, los líquidos pueden, si procede, aplicarse directamente) se distribuyen 0,5 ml de la sustancia en un algodón, que se aplica a la zona de ensayo y se mantiene en contacto con la piel por medio de un apósito oclusivo o una cámara y una sujeción adecuada durante 6 horas.

Día 0 — lote testigo

Se elimina el pelo de un costado. Se aplica sólo el vehículo a la zona de ensayo, según el mismo método, y se mantiene en contacto con la piel por medio de un apósito oclusivo o una cámara y una sujeción adecuada durante 6 horas.

Séptimo y decimocuarto días

Se hace la misma aplicación que el día 0 en la misma zona de ensayo (eliminar el pelo si es necesario), los días séptimo y decimocuarto.

1.6.2.3.2. Provocación

Vigésimo octavo día

Se elimina el pelo del otro costado de los animales tratados y testigo. Se aplica un apósito oclusivo o una cámara que contenga 0,5 ml de la sustancia de ensayo, a la máxima concentración no irritante, a la parte posterior del costado de los animales tratados. Se aplica también a la parte anterior del costado un apósito oclusivo o una cámara con vehículo solo.

Los apósitos oclusivos se mantienen en contacto mediante una sujeción adecuada durante 6 horas.

El lote testigo se somete a la misma manipulación.

Vigésimo noveno y trigésimo días

— la zona de provocación se limpia y se limpia de pelo, si es necesario, 21 horas después de quitar el apósito

— tres horas más tarde (30 horas desde el comienzo del ensayo de provocación) se observa y registra la reacción cutánea,

— se hace una segunda observación 24 horas después de la anterior (54 horas) y se registra.

1.6.2.3.3. Observación y graduación

Deben registrarse y consignarse en el informe todas las reacciones cutáneas y todas las observaciones no habituales que se deriven de los procedimientos de inducción y provocación.

Pueden utilizarse técnicas como el estudio histopatológico o la medida del espesor del pliegue cutáneo para aclarar reacciones o respuestas dudosas, enmascaradas por la tinción de la piel por la sustancia de ensayo.

2. RESULTADOS (ensayo de maximización en cobayas y ensayo de Buehler)

Los resultados deben inventariarse en un cuadro que indique, para cada animal, las reacciones cutáneas anotadas en cada observación.

3. INFORME (ensayo de maximización en cobayas y ensayo de Buehler)

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— cepa de cobaya utilizada,

— condiciones del ensayo, vehículo y concentraciones de la sustancia utilizadas para la inducción y la provocación,

— número, edad y sexo de los animales,

— peso de cada animal al comienzo y al final del ensayo,

— cada observación individual realizada en cada animal, incluido el sistema de graduación si se hubiera utilizado,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN (ensayo de maximización en cobayas y ensayo de Buehler)

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.7. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) VÍA ORAL

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo, por vía oral y en dosis diversas a varios lotes de animales, a razón de una dosis por lote durante un período de 28 días. Durante el período de administración, se observa a los animales todos los días con el fin de descubrir los efectos tóxicos. Se practica la autopsia a los animales que mueren durante el ensayo y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se elígen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en lotes. Las sustancias de ensayo pueden ser administradas con el alimento, por alimentación forzada, en cápsulas o con el agua. Las dosis deben administrarse de la misma manera durante todo el experimento. Si para facilitar la administración se utiliza un vehículo u otros aditivos, éstos no deben ser tóxicos. Pueden utilizarse los datos ya publicados.

1.6.2. Condiciones del ensayo

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Salvo indicación contraria, la rata es la especie idónea. Hay que utilizar animales jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente; en condiciones ideales, la sustancia debe empezar a administrarse antes de que las ratas alcancen las seis semanas de edad; en ningún caso pueden tener más de ocho semanas.

Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales utilizados no debe exceder del ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse por lo menos 10 animales (5 hembras y 5 machos) para cada dosis. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el experimento habrá que añadir al número de animales la cantidad que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con la dosis más elevada durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. *Dosis*

Se utilizan al menos 3 dosis y un testigo. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma forma que los de los lotes de ensayo. Si para facilitar la administración se utiliza un vehículo, éste se administrará también a los testigos, procediendo de la misma forma que con los lotes tratados; el volumen será el mismo que se administre al lote tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o sólo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone de una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la dosis más baja administrada debe ser superior a este valor. En condiciones óptimas, la dosis media debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias dosis intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una gradación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a las dosis bajas o intermedias, así como en el lote testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

Cuando la sustancia de ensayo se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm o mg/kg de comida) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe precisarse el método escogido. En el caso de una sustancia administrada por alimentación forzada, las dosis deben administrarse todos los días a la misma hora y su cantidad debe adaptarse (semanal o bisemanalmente) a fin de conservar un nivel de dosis constante por unidad de peso del animal.

1.6.2.4. *Prueba límite*

Si durante un experimento de 28 días efectuado según el método descrito a continuación, con una dosis de 1 000 mg/kg por de peso corporal y por día o con una dosis más elevada, en función de una posible exposición humana (si se conoce), no se descubre ningún efecto tóxico, puede ser innecesario continuar el experimento. Cuando se trata de sustancias de baja toxicidad, administradas con el alimento, es preciso asegurarse de que su cantidad o sus propiedades no interfieren con las exigencias nutricionales normales.

1.6.2.5. *Período de observación*

Se deben observar todos los animales diariamente y registrar los síntomas de toxicidad así como el momento de su aparición, su intensidad y su duración. Asimismo deben registrarse el momento de la muerte y el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad.

1.6.3. **Procedimiento**

Las dosis de sustancia se administran a los animales, en condiciones óptimas, todos y cada uno de los días, durante un periodo de 28 días. Los animales de los lotes satélite previstos para las observaciones complementarias deben mantenerse en observación durante 14 días más, sin tratamiento, con el fin de descubrir la recuperación o la persistencia de los efectos tóxicos.

La observación debe incluir las modificaciones del pelo, la piel, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. El consumo alimentario (y el consumo de agua cuando la sustancia de ensayo se administre con el agua de bebida) y el peso de los animales deben determinarse cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para tratar, en la medida de lo posible, no se pierdan por razones como el canibalismo, autolisis de los tejidos o error de emplazamiento. Al final del periodo de estudio, se hará la autopsia en todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos y los que presenten angustia o dolor graves se retirarán inmediatamente, se sacrificarán de forma humanitaria y se les hará la autopsia.

Al terminar el periodo de ensayo se efectuarán los siguientes exámenes sobre todos los animales, incluidos los testigos:

1. examen hematológico que incluya al menos el hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de los hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria y un estudio de la coagulación;

2. determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre que incluyan al menos un parámetro sobre las funciones hepática y renal: alanina-aminotransferasa (conocida antiguamente con el nombre de glutamato-piruvato-transaminasa) y aspartato aminotransferasa (conocida antiguamente con el nombre de glutamato-oxalacetato-transaminasa) del suero, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plásmatica, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada incluyen el calcio, el fósforo, los cloruros, el sodio, el potasio, la glucosa en ayunas, los lípidos, las hormonas, el equilibrio ácido básico, la metahemoglobina y la actividad colinesterásica.

Si es necesario, pueden efectuarse otros análisis bioquímicos clínicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.3.1. *Autopsia general*

Se debe practicar una autopsia general completa a todos los animales del ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección, para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos (hígado, riñones, bazo, testículos, glándulas suprarrenales y corazón, así como cualquier otro órgano que presente lesiones macroscópicas o modificaciones volumétricas) deberán conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores.

1.6.3.2. *Examen histopatológico*

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos conservados del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones atribuibles a la sustancia de ensayo en el nivel de dosis más elevado deberán examinarse en todos los lotes que hayan estado expuestos a dosis más bajas. Deberá hacerse un examen histológico a todos los animales de los lotes satélites, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los otros lotes tratados.

2. **RESULTADOS**

Los resultados deberán inventariarse en una tabla que indique, para cada lote del experimento, el número de animales al principio del ensayo y el número de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Todos los resultados observados deben evaluarse por medio de un método estadístico adecuado. Podrá utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario etc.,
— condiciones de ensayo,
— dosis (incluido, en su caso, el vehículo) y concentraciones,
— respuesta tóxica por sexo y por dosis,
— nivel que no produce ningún efecto (si es posible),
— momento de la muerte durante el experimento o indicación de que los animales han sobrevivido al mismo,
— efectos tóxicos u otros,
— momento de observación de cualquier síntoma anormal y su evolución,
— cantidades de alimento y peso corporal,
— análisis hematológicos practicados y resultados completos,
— análisis bioquímicos clínicos practicados y resultados completos,
— resultados de la autopsia,
— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,
— tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda,
— discusión de los resultados,
— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.8. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) POR INHALACIÓN

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es útil disponer de información preliminar sobre la distribución de las partículas por tamaño, la presión de vapor, el punto de fusión, el punto de ebullición, el punto de inflamación y la capacidad explosiva (si procede) de la sustancia.

Véase también la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen varios grupos de animales, diariamente, durante un tiempo determinado, a la sustancia de ensayo en concentraciones distintas, utilizándose una sola concentración para cada lote, durante un período de 28 días. Cuando se utilice un vehículo para obtener una concentración adecuada de la sustancia en la atmósfera, se utilizará un lote testigo para el vehículo. Durante el período de administración se observa diariamente a los animales a fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueren durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en lotes. Si es necesario, se puede añadir un vehículo apropiado a la sustancia de ensayo para obtener una concentración apropiada de ésta en la atmósfera. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar las dosis, éstos no deberán ser tóxicos. Pueden utilizarse datos ya publicados.

1.6.2. Condiciones de ensayo

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Salvo indicación contraria, la rata es la especie idónea. Hay que utilizar animales jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente.

Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales no debe exceder del ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse diez animales (5 hembras y 5 machos) para cada lote experimental. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el experimento, habrá que añadir la cantidad de animales que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con la dosis más elevada durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. *Concentración de exposición*

Son necesarias al menos tres concentraciones, así como un lote testigo y, en su caso, un lote testigo para el vehículo (la concentración del vehículo debe ser la del nivel de exposición más elevado). A excepción de la inhalación de la sustancia, los animales del grupo testigo deben ser tratados de la misma forma que los de los grupos experimentales. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o sólo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la concentración más baja administrada debe ser superior a este valor. En condiciones ideales, la concentración intermedia debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias concentraciones intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una gradación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a las concentraciones bajas e intermedias, así como en los lotes testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

1.6.2.4. *Período de exposición*

La exposición diaria debe ser de 6 horas, pero pueden resultar necesarios otros períodos de exposición para responder a algunas exigencias específicas.

1.6.2.5. *Equipo*

Los animales deben estar expuestos a la sustancia por medio de un dispositivo de inhalación que asegure un flujo continuo de aire de al menos 12 renovaciones por hora, garantizando un contenido en oxígeno apropiado y un reparto uniforme del producto de ensayo en el aire. Si se utiliza una cámara, debe estar concebida para impedir el amontonamiento de los animales y asegurar su exposición máxima, por inhalación de la sustancia de ensayo. Por regla general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de una cámara se debe procurar que el «volumen» total de animales de laboratorio no sobrepase el 5 % del volumen de la cámara de ensayo. También se puede recurrir a un sistema de exposición oro-nasal, únicamente de la cabeza o de cuerpo entero, en una cámara individual; con los dos primeros tipos de exposición se evita la absorción de la sustancia por otras vías.

1.6.2.6. *Período de observación*

Deberá observarse diariamente a los animales para descubrir los síntomas de toxicidad durante todo el período de tratamiento y de recuperación. Deberán registrarse el momento de la muerte y el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad.

1.6.3. Procedimiento

Los animales están expuestos a la sustancia de ensayo diariamente entre 5 y 7 días por semana, durante un período de 28 días. Los animales de los grupos satélite destinados a observaciones complementarias deberán mantenerse en observación durante 14 días más, sin tratamiento, con el fin de descubrir la desaparición o la persistencia de los efectos tóxicos. La temperatura a la que se efectúa el ensayo debe ser de 22 °C ± 3 °C.

En condiciones ideales, la humedad relativa debe mantenerse entre el 30 y el 70 %, pero, en algunos casos, esto puede resultar imposible (por ejemplo, ensayos con aerosoles). Se puede evitar la pérdida de sustancia por dispersión a la zona circundante manteniendo una ligera presión negativa (≤ 5 mm de agua) dentro de la cámara. Durante la exposición los animales no deben recibir alimento ni agua.

Es conveniente utilizar un sistema de inhalación que funcione en condiciones dinámicas provisto de un dispositivo adecuado para el control analítico de la concentración. Para determinar las concentraciones de exposición adecuadas, se recomienda proceder a un ensayo preliminar. El caudal deberá ajustarse de manera que las concentraciones sean homogéneas en toda la cámara. El sistema debe permitir obtener lo más rápidamente posible unas condiciones de exposición estables.

Se debe medir o controlar:

(a) el caudal de aire (permanentemente);

(b) la concentración real de la sustancia de ensayo, medida en la zona de respiración. Durante el período de exposición diaria la concentración no debe variar en más de ± 15 % respecto del valor medio. Sin embargo, en el caso de algunos aerosoles, es difícil alcanzar este grado de control, aceptándose en dichos casos una diferencia mayor. Durante todo el ensayo hay que mantener las concentraciones diarias lo más constantes posible. En el caso de los aerosoles, se hará al menos un análisis semanal del tamaño de las partículas en cada lote de ensayo;

(c) temperatura y humedad, permanentemente si es posible.

Las observaciones tienen lugar durante y después de la exposición y se registran sistemáticamente; deben conservarse individualmente los datos de cada animal. Deben observarse diariamente todos los animales y registrar los síntomas de toxicidad, así como el momento de su aparición, su intensidad y su duración. La observación incluirá las modificaciones del pelo y la piel, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. El peso de los animales debe determinarse cada semana. Se recomienda igualmente medir el consumo alimentario cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para procurar que no se pierdan en el ensayo por razones como el canibalismo, autolisis de los tejidos o error de emplazamiento. Al final del ensayo se practicará la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos y los que muestren angustia o dolor graves deberán ser retirados inmediatamente, se sacrificarán de forma humanitaria y se les practicará la autopsia.

Los exámenes que figuran a continuación se efectuarán en todos los animales (incluidos los testigos) al terminar el ensayo:

(i) análisis hematológico que incluya al menos el hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria, así como un estudio de la coagulación;

(ii) determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre incluyendo al menos un parámetro sobre las funciones hepática y renal: alanina aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamano-piruvato-transaminasa) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamato-oxalacetato-transaminasa) del suero, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada incluyen el calcio, el fósforo, los cloruros, el sodio, el potasio, la glucosa en ayunas, los lípidos, las hormonas, el equilibrio ácido-básico, la metahemoglobina y la actividad colinesterásica.

Si es necesario pueden realizarse otros análisis bioquímicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.3.1. *Autopsia general*

Se deberá practicar una autopsia general completa a todos los animales del ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, los pulmones y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos deben conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores: las vías respiratorias, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, las glándulas suprarrenales y el corazón, así como todos los órganos que presenten lesiones macroscópicas o modificaciones volumétricas. Los pulmones deben extraerse enteros, pesarse y tratarse con un fijador adecuado para conservar la estructura pulmonar.

1.6.3.2. *Examen histopatológico*

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos conservados del lote expuesto a la concentración más alta y del lote o lotes testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones atribuibles a la sustancia de ensayo en la concentración más elevada deben ser examinados en todos los grupos que hayan estado expuestos a concentraciones más bajas. Deberá someterse a un examen histopatológico a los animales de todos los grupos satélite, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los otros lotes tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados deben inventariarse en una tabla que indique, para cada lote de ensayo, el número de animales al comienzo del ensayo y el número de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Todos los resultados observados deben evaluarse por medio de un método estadístico adecuado. Puede utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.,

— condiciones de ensayo:

Hay que describir el aparato de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema generador de aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire de salida y, en su caso, método de alojamiento de los animales en la cámara de ensayo. Debe describirse el equipo utilizado para medir la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosoles o la granulometría.

Datos relativos a la exposición:

Deben presentarse en forma de tabla, indicando los valores medios y una medida de la variabilidad (por ejemplo, desviación típica); deben incluir, en la medida de lo posible:

a) caudales de aire a través del dispositivo de inhalación,

b) temperatura y humedad del aire,

c) concentraciones nominales (cantidad total de sustancia de ensayo introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen del aire),

d) en su caso, naturaleza del vehículo,

e) concentraciones reales en la zona de respiración,

f) diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) y desviación geométrica típica (DGT),

— respuesta tóxica por sexo y concentración,

— momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido a la misma,

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo; nivel que no causa ningún efecto,

— momento de observación de cualquier síntoma anormal y evolución del mismo,

— cantidades de alimento y peso corporal,

— análisis hematológicos practicados y resultados de éstos,

— pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados de éstas,

— resultados de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.9. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) VÍA CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia de ensayo se aplica diariamente por vía cutánea en dosis distintas a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis para cada lote, durante un período de 28 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales a fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueren durante el ensayo así como a los que sobreviven al final del mismo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos, durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en lotes tratados y lotes testigo. Poco tiempo antes del ensayo se esquila la piel de la región dorsal de los animales. Se puede recurrir al rasurado, pero, en este caso, debe efectuarse unas 24 horas antes del ensayo. Suele ser necesario repetir el esquileo o el rasurado aproximadamente cada semana. Durante el esquileo o el rasurado hay que procurar no causar lesiones en la piel. La superficie que hay que despejar para aplicar la sustancia de ensayo no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Debe tenerse en cuenta el peso del animal para decidir la zona que hay que despejar y las dimensiones de la superficie que se va a tratar. Cuando la sustancia sea sólida (que, si es preciso, puede pulverizarse), deberá humedecerse con agua o, en su caso, con un vehículo apropiado, de forma que se asegure un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se utilizan generalmente sin diluir. Se procede a una aplicación diaria, entre 5 y 7 días por semana.

1.6.2. Condiciones de ensayo

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Pueden utilizarse ratas, conejos o cobayas adultos. Se pueden utilizar también otras especies pero, en este caso, se habrá de justificar su utilización.

Al principio del ensayo la diferencia de peso entre los animales no debe exceder del ± 20 % del valor medio adecuado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse al menos diez animales (5 hembras y 5 machos) de piel sana, para cada dosis. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el ensayo habrá que añadir la cantidad de animales que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con el nivel de dosis más elevado durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. *Dosis*

Se utilizan al menos tres dosis, así como un lote testigo y, en su caso, un lote testigo para el vehículo. El período mínimo de exposición será de 6 horas diarias.

La sustancia de ensayo debe aplicarse todos los días a la misma hora y las dosis deben adaptarse semanalmente o bisemanalmente con objeto de conservar un nivel de dosis constante respecto al peso corporal de los animales. A excepción de la administración de las sustancias de ensayo, debe tratarse a los animales del lote testigo de la misma forma que a los de los lotes experimentales. Cuando para facilitar la administración se utilice un vehículo, éste se administrará también al lote testigo, del vehículo en las mismas condiciones que a los lotes tratados; la dosis será la misma que se administre al grupo tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o sólo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone de una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la dosis más baja administrada debe superar este valor. En condiciones óptimas la dosis intermedia debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias dosis intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una graduación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a dosis bajas o intermedias, así como en los lotes testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

Si la aplicación de la sustancia de ensayo provoca una irritación cutánea grave, deben reducirse las concentraciones; esto puede producir una disminución, incluso una desaparición, de otros efectos tóxicos en las dosis más elevadas. Si las lesiones cutáneas son muy graves, puede resultar necesario detener el experimento y comenzar de nuevo con concentraciones más bajas.

1.6.2.4. *Prueba límite*

Si en un experimento preliminar realizado con una dosis de 1 000 mg/kg, o con una dosis más elevada en función de una posible exposición humana (si se conoce), no se ha observado ningún efecto tóxico, puede ser innecesario continuar el experimento.

1.6.2.5. *Período de observación*

Se deben observar todos los animales diariamente con el fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Debe registrarse el momento de la muerte, así como el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad.

1.6.3. Procedimiento

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. En condiciones óptimas, la sustancia se administra a los animales todos los días, durante un período de 28 días. Los animales de todos los grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse en observación 14 días más, sin tratamiento, para comprobar la curación o la persistencia de los efectos tóxicos. La duración mínima de la exposición debe ser de 6 horas diarias. La sustancia debe aplicarse uniformemente sobre una superficie equivalente más o menos al 10 % de la superficie total corporal. Cuando se trata de sustancias altamente tóxicas, la superficie cubierta puede ser menor, pero procurando que al aplicar la sustancia se forme en toda la superficie una capa lo más fina y uniforme posible.

Durante la exposición, la sustancia se mantiene en contacto con la piel mediante un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante. Además, la superficie tratada debe estar convenientemente cubierta para mantener en su sitio el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Pueden utilizarse aparatos de contención para impedir la ingestión de la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa. Puede usarse un dispositivo protector en forma de collar como método alternativo.

Al término del período de exposición, hay que eliminar cualquier residuo de sustancia, a ser posible, con agua, o con cualquier otro procedimiento adecuado de limpieza de la piel.

Deben observarse todos los animales diariamente y registrar los síntomas de toxicidad, así como el momento de su aparición, su intensidad y su duración. La observación incluirá las modificaciones del pelo y la piel, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Semanalmente deben determinarse los pesos de los animales y se recomienda igualmente medir el consumo alimentario cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para procurar que no se pierdan en el experimento por razones como el canibalismo, autolisis de los tejidos o error de emplazamiento. Al término de la experiencia se practica la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos y los que presenten angustia o dolor graves se retirarán inmediatamente, se sacrificarán de forma humanitaria y se les practicará la autopsia.

Al terminar el ensayo se efectuarán los siguientes análisis en todos los animales (incluidos los del lote testigo):

1. análisis hematológico que incluya al menos el hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria, así como un estudio de la coagulación;

2. determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre incluyendo al menos un parámetro sobre las funciones hepáticas y renal: alanina-aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamato-piruvato-transaminasa) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocido con el nombre de glutamato-oxalacetato-transaminasa) del suero, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada incluyen el calcio, fósforo, cloruros, sodio, potasio, glucosa en ayunas, lípidos, hormonas, el equilibrio ácido-básico, metahemoglobina y la actividad colinesterásica.

Si es necesario, pueden realizarse otros análisis bioquímicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.4. **Autopsia general**

Se practicará una autopsia general completa a todos los animales sometidos al ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección, para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos, es decir, la piel normal y tratada, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, las glándulas suprarrenales, el corazón y los órganos diana (es decir los que presentan lesiones importantes o modificaciones volumétricas) deben conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores.

1.6.5. **Examen histopatológico**

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos que se conserven del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones inducidas por la sustancia de ensayo en el nivel de dosis más elevado, deben examinarse en todos los lotes que hayan estado expuestos a dosis más bajas. Los animales del lote satélite deberán someterse a un examen histológico, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los demás lotes tratados.

2. **RESULTADOS**

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote de ensayo, el número de animales al comienzo del ensayo y el número de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Todos los resultados observados deben evaluarse por medio de un método estadístico adecuado. Puede utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— datos relativos a los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.),

— condiciones de ensayo, (incluido el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),

— dosis (en su caso, también el vehículo) y concentraciones,

— nivel que no produce ningún efecto, si es posible,

— respuesta tóxica por sexo y dosis,

— momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido,

— efectos tóxicos u otros,

— momento de observación de cualquier síntoma anormal y su evolución,

— cantidades de alimento y peso corporal,

— análisis hematológicos practicados y resultados,

— pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados,

— resultados de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.10. ENSAYO CITOGENÉTICO «IN VITRO» EN MAMÍFEROS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto C).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo citogenético *in vitro* es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo destinado a descubrir aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamíferos en cultivo. Pueden utilizarse cultivos de líneas celulares establecidas, así como cultivos de células primarias. Después de la exposición a las sustancias de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica, se tratan los cultivos celulares con un inhibidor mitótico, como la colchicina, con el fin de acumular las células en un estadio de la mitosis similar a la metafase (c-metafase). Las células se recolectan en el momento oportuno y se hacen preparaciones cromosómicas. Se tiñen estas preparaciones y se analizan las células en metafase para descubrir las aberraciones cromosómicas.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

1.6.1.1. *Células*

Se utilizan líneas celulares establecidas o cultivos de células primarias, por ejemplo, células de hámster chino y linfocitos humanos. Las sustancias de ensayo se preparan en medio de cultivo o se disuelven en vehículos apropiados antes del tratamiento de las células.

1.6.1.2. *Sistema de activación metabólica*

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo tanto en presencia de un sistema adecuado de activación metabólica como sin este sistema. El sistema más comúnmente utilizado es una fracción postmitocondrial suplementada con cofactor, preparada a partir de hígado de roedores tratados con agentes inductores de enzimas.

1.6.2. Condiciones de ensayos

Número de cultivos

Se utilizan al menos dos cultivos para cada ensayo.

Utilización de testigos positivos y negativos

Se utilizan como testigos negativos el disolvente (cuando no sea el medio de cultivo o el agua), la mezcla de activación de enzimas hepáticas, la mezcla de activación de enzimas hepáticas con el disolvente y los testigos no tratados.

Se incluye un testigo positivo en cada experimento; cuando se utilice la mezcla de activación de enzimas hepáticas para activar la sustancia de ensayo, el testigo positivo deberá ser una sustancia que necesite una activación metabólica.

Dosis

Como mínimo se utilizan tres dosis de la sustancia de ensayo en un intervalo de al menos una unidad logarítmica; la dosis más elevada reducirá la actividad mitótica alrededor de un 50 % o mostrará alguna indicación de citotoxicidad. Si no es tóxica, la sustancia de ensayo se probará hasta su límite de solubilidad o hasta una concentración máxima de 5 mg/ml.

Condiciones de cultivo

Se utiliza un medio de cultivo y condiciones de incubación apropiados (por ejemplo, temperatura, recipientes de cultivo, concentraciones de CO_2 y humedad).

1.6.3. Procedimiento

1.6.3.1. *Preparación de los cultivos*

Líneas celulares establecidas: las células se obtienen a partir de cultivos madre (por ejemplo, por tripsinización o por agitación vigorosa), se siembran en recipientes de cultivo a la densidad adecuada y se incuban a 37 °C.

Linfocitos humanos: se añade sangre completa heparinizada a un medio de cultivo que contenga fitohemaglutinina, suero de feto de ternera y antibióticos, y se incuba a 37 °C.

1.6.3.2. *Tratamiento de los cultivos con la sustancia de ensayo*

i) Tratamiento sin mezcla de activación de enzimas hepáticas

Todos los tratamientos deben cubrir, a ser posible, al menos el período de un ciclo celular completo y los sistemas de fijación deben garantizar el análisis de las primeras mitosis posteriores al tratamiento de las células tratadas en los distintos estadios del ciclo.

Cuando el tratamiento no cubre un ciclo celular completo, se escogen tiempos de fijación múltiples para extraer muestras de células que se encuentren en estadios diferentes del ciclo celular durante el tratamiento, es decir G_1, S y G_2.

La sustancia de ensayo se añade a los cultivos de líneas celulares establecidas cuando estas estén en su fase de crecimiento exponencial. Los cultivos de linfocitos humanos se tratan cuando aún están en estado semisincrónico.

ii) Tratamiento con mezcla de activación de enzimas hepáticas

Para el tratamiento, la sustancia de ensayo en combinación con la mezcla de activación de enzimas hepáticas debe estar presente el mayor tiempo posible, aunque sin llegar a producir un efecto tóxico en las células. Si, por razones de toxicidad, el tratamiento no puede cubrir el período de un ciclo celular completo, se deben escoger tiempos de fijación múltiples para extraer muestra de células que se encuentren en diferentes estadios del ciclo celular en el momento del tratamiento, es decir G_1, S y G_2.

Recolección de las células

Los cultivos celulares se tratan con un inhibidor del huso mitótico antes de su recolección durante un período adecuado. Para la preparación de los cromosomas, cada cultivo se recolecta y trata por separado.

Se necesitan al menos dos momentos de recolección de células. Se recomienda que uno se haga aproximadamente al final de un ciclo celular y otro más tarde; ello permite abarcar con seguridad todos los estadios del ciclo celular y prevé los retrasos de éste.

1.6.3.3. *Preparación de los cromosomas*

La preparación de los cromosomas comprende un tratamiento hipotónico de las células, la fijación, la distribución en portaobjetos y la tinción.

Análisis

Para descubrir las aberraciones cromosómicas, de cada cultivo se analizan al menos 100 metafases bien distribuidas. Los portaobjetos se codifican antes del análisis. En los linfocitos humanos sólo se analizan las metafases que contengan 46 centrómeros.

En las líneas celulares establecidas, sólo se analizan las metafases con ± 2 centrómeros del número modal.

Además debe valorarse durante el ensayo, para cada dosis, el índice mitótico o cualquier otra indicación de citotoxicidad, cuando proceda.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tabla. Se registrarán por separado las aberraciones de tipo cromatídico (lagunas, fracturas, intercambios), las aberraciones de tipo cromosómico (p. ej, lagunas, fracturas, cromosomas enanos, anillos, dicéntricos, policéntricos) y el número de metafases anormales (lagunas incluidas y excluidas), tanto de todos los cultivos tratados como de los cultivos testigo.

Los resultados se evaluarán con métodos estadísticos apropiados.

Los resultados se compararán con testigos negativos concomitantes.

Se realizarán al menos dos ensayos independientes. Sin embargo, si hay justificación científica, puede bastar un ensayo único. No es necesario realizar el segundo de forma idéntica al ensayo inicial. De hecho, puede ser preferible alterar algunas condiciones del ensayo para obtener datos más útiles.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— células utilizadas,

— condiciones del ensayo: composición del medio, concentración de CO_2, temperatura de incubación, duración de la incubación, dosis, momento del tratamiento, duración del tratamiento con el inhibidor de huso mitótico y concentración de éste, tipo de mezcla de activación de enzimas hepáticas utilizada, testigos positivos y negativos,

— número de cultivos celulares,

— número de metafases analizadas (por separado para cada cultivo),

— índice mitótico u otras indicaciones de citotoxicidad,

— tipo y número de aberraciones por separado para cada cultivo tratado y testigo, número modal de cromosomas en las líneas celulares establecidas utilizadas,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.11. ENSAYO CITOGENÉTICO IN VIVO EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFEROS, ANÁLISIS CROMOSÓMICO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto C).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo citogenético *in vivo* es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo destinado a descubrir aberraciones cromosómicas estructurales que, generalmente, se evalúan durante la primera mitosis consecutiva al tratamiento. Con los mutágenos químicos, la mayor parte de las aberraciones inducidas son de tipo cromatídico.

En este método, se utilizan células de médula ósea de mamíferos expuestos, por vías apropiadas, a las sustancias de ensayo y sacrificados a intervalos sucesivos. Antes de sacrificarlos, se trata a los animales por medio de sustancias tales como la colchicina, que actúan como inhibidores del huso, con el fin de acumular las células en una fase de mitosis del tipo metafásico (c-metafase). A partir de las células se efectúan preparaciones de cromosomas secadas al aire y, después, teñidas; a continuación se analizan las metafases en el microscopio para observar las aberraciones cromosómicas.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

Se disuelven las sustancias de ensayo en suero fisiológico. Si se trata de sustancias insolubles, se disuelven o se ponen en suspensión en vehículos apropiados.

Se utilizan soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas. Si para facilitar la administración se utiliza un vehículo, éste no debe interferir con la sustancia de ensayo ni producir efectos tóxicos.

1.6.2. Condiciones de prueba

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Se utilizan roedores tales como la rata, el ratón o el hámster chino. Se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos, y se reparten en lotes tratados y lotes testigo.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Se utilizan por lo menos 5 hembras y 5 machos en cada lote de ensayo y en cada lote testigo. Por lo tanto, se sacrificarán 10 animales por periodo y por lote si el programa del ensayo establece varios momentos de observación después del tratamiento. En el caso del lote testigo positivo, hasta un solo tiempo de muestreo.

1.6.2.3. *Vía de administración*

En general, las sustancias de ensayo sólo deben administrarse una vez. En función de la información toxicológica de que se disponga, podrá aplicarse un programa de administración repetida. No obstante, éste sólo se podrá aplicar si la sustancia de ensayo no produce un efecto citotóxico sobre la médula ósea. La administración se hace generalmente por vía oral o por inyección intraperitoneal. Tambien pueden ser apropiadas otras vías de administración.

1.6.2.4. *Utilización de testigos positivos y negativos*

Como testigo positivo se utiliza una sustancia que produzca aberraciones cromosómicas *in vivo*, incluyendo igualmente en el plan de cada ensayo un lote testigo negativo (disolvente).

1.6.2.5. *Dosis*

Para el ensayo de base se utiliza una dosis de la sustancia de ensayo que debe ser la dosis máxima tolerada o la que haga aparecer algunos signos de citotoxicidad como, por ejemplo, una inhibición parcial de la mitosis.

Para los compuestos «no tóxicos», la dosis máxima (límite) que debe investigarse tras una administración única es de 2 000 mg/kg de peso corporal.

Si se utiliza un protocolo de dosis repetidas, la dosis límite es de 1 000 mg/kg de peso corporal.

Pueden utilizarse otras dosis suplementarias cuando razones de orden científico así lo exijan.

Si el ensayo sirve de método de verificación, es conveniente utilizar al menos dos dosis suplementarias.

1.6.3. Procedimiento

El ensayo puede realizarse de dos maneras:

(i) se administra a los animales, en una sola vez, la sustancia de ensayo a la dosis máxima tolerada. De entrada, se toman muestras a las 24 horas después del tratamiento. Si los resultados son claramente positivos en este estadio, no será necesario tomar más muestras. No obstante, si los resultados son negativos o dudosos, dado que la cinética del ciclo celular puede verse influida por la sustancia de ensayo, se realizará una toma anterior y una toma posterior a intervalos apropiados entre las 6 y 48 horas siguientes a la administración de la sustancia.

Cuando se utilicen dosis suplementarias, habrá que extraer las muestras en el período de sensibilidad máxima, o si no se conoce, 24 horas después del tratamiento;

(ii) si la información farmacocinética y metabólica aconseja un programa de tratamiento repetido, se puede aplicar una administración repetida, tomando las muestras 6 y 24 horas después del último tratamiento.

Preparación de la médula ósea

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta, por vía intraperitoneal, una dosis adecuada de inhibidor de huso mitótico para obtener un número apropiado de células en c-metafase. Se extrae la médula ósea de los dos fémures de cada uno de los animales recién sacrificados, mediante enjuague con una solución isotónica. Después de un tratamiento hipotónico idóneo, se fijan las células y luego se distribuyen en portaobjetos. Una vez se hayan secado al aire, los portaobjetos se tiñen.

Análisis

Los portaobjetos se codifican antes de analizarlos en el microscopio. Se analizan, por cada animal, al menos 50 metafases bien distribuidas que incluyan el número completo de centrómeros, para descubrir las aberraciones cromosómicas estructurales. Además, pueden establecerse los índices mitóticos para cada animal.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tabla. Se registrarán por separado y para todos los animales tratados y testigos las aberraciones de tipo cromatídico e isocromatídico (lagunas, gaps, fracturas, intercambios) y el número de metafases anormales (lagunas incluídas y excluídas) así como los índices mitóticos (cuando se establezcan). Igualmente se registrarán las medias y las desviaciones típicas obtenidas para cada lote tratado y para cada lote testigo. Los resultados se evaluarán mediante los métodos estadísticos adecuados.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa y edad de los animales utilizados,

— número de animales de cada sexo de los lotes de ensayo y de los testigos,

— condiciones de ensayo: descripción detallada del programa de tratamiento y de extracción de muestras, dosis, duración del tratamiento con el inhibidor de huso mitótico usado y su concentración,

— número de metafases analizadas por animal,

— índices mitóticos (si se han establecido),

— tipo y número de aberraciones por separado para cada animal tratado y testigo,

— signos de toxicidad durante el estudio,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.12. MUTAGENICIDAD (ENSAYO DE MICRONÚCLEOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto C).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba de micronúcleos es un ensayo *in vivo* a corto plazo destinado a descubrir las lesiones cromosómicas o del aparato mitótico inducidas por sustancias químicas. Este ensayo se basa en un aumento del número de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de los animales tratados respecto de los animales testigo.

Los micronúcleos están formados por fragmentos de cromosomas o por cromosomas enteros retrasados en la mitosis. Cuando los eritroblastos se transforman en eritrocitos, el núcleo principal es expulsado, mientras que el micronúcleo puede ser conservado en el citoplasma. Para este ensayo se utilizan eritrocitos policromáticos jóvenes procedentes de la médula ósea de mamíferos de laboratorio que hayan estado expuestos, por las vías apropiadas, a la sustancia de ensayo. Después de extraer la médula ósea, se preparan y tiñen frotis. Se cuenta en el microscopio el número de micronúcleos presentes en los eritrocitos policromáticos y se establece la relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Las sustancias de ensayo se disuelven en solución isotónica. Si se trata de sustancias insolubles, se disuelven o se ponen en suspensión en vehículos adecuados. Si se utiliza un vehículo, no debe interferir con la sustancia de ensayo ni producir efectos tóxicos. Normalmente, se utilizan soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas.

1.6.2. **Condiciones de prueba**

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Se recomienda utilizar ratones, pero también pueden utilizarse otros mamíferos. Se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos, y se reparten en lotes tratados y lotes testigo.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Se utilizan por lo menos 5 hembras y 5 machos en cada lote experimental y en cada lote testigo. Por lo tanto, se sacrificarán 10 animales por período y por lote si el programa establece varios momentos de observación después del tratamiento. En el caso del lote testigo positivo, basta una sola toma de muestras.

1.6.2.3. *Vía de administración*

En general, las sustancias de ensayo sólo deben administrarse una vez. En función de la información toxicológica de que se disponga, podrá aplicarse un programa de administración repetida. No obstante, éste sólo se podrá aplicar si la sustancia de ensayo no produce un efecto citotóxico sobre la médula ósea. La administración se hace generalmente por vía oral o por inyección intraperitoneal. Tambien pueden ser apropiadas otras vías de administración.

1.6.2.4. *Utilización de testigos positivos y negativos*

Se utilizarán testigos positivos y negativos (disolvente) en cada prueba.

1.6.2.5. *Dosis*

Para el ensayo de base se utiliza una sola dosis de la sustancia de ensayo, que debe ser la dosis máxima tolerada o la que haga aparecer algunos signos de citotoxicidad como, por ejemplo, una modificación parcial de la relación eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos.

La dosis máxima (límite) de compuestos «no tóxicos» que debe investigarse tras la administración de una dosis única es de 2 000 mg/kg de peso corporal.

Si se emplea un programa de administración repetida, la dosis límite será de 1 000 mg/kg de peso corporal y día.

Pueden utilizarse otras dosis suplementarias cuando razones de orden científico así lo exijan.

Si el ensayo sirve de método de verificación es conveniente utilizar al menos dos dosis suplementarias.

1.6.3. **Procedimiento**

El ensayo puede realizarse de dos maneras:

(i) se administra a los animales, en una sola vez, la sustancia de ensayo. Las tomas de muestras deben efectuarse en el momento correspondiente a la sensibilidad máxima del ensayo, el cual varía según la sustancia de ensayo. Por eso, se extraen muestras de médula ósea al menos en dos ocasiones, no antes de 12 horas tras el tratamiento y sin sobrepasar las 48 horas.

Cuando se utilicen dosis suplementarias, es conveniente tomar muestras en el período de máxima sensibilidad o, si no se conoce, 24 horas después del tratamiento;

(ii) si la información farmacocinética y metabólica aconseja un programa de tratamiento repetido, se puede aplicar una administración repetida, tomando las muestras en una ocasión, no antes de 12 horas después del último tratamiento.

Preparación de la médula ósea

La médula ósea se extrae de los dos fémures de cada uno de los animales recién sacrificados mediante enjuague con suero de ternera fetal. Las células se sedimentan por centrifugación y se descarta el sobrenadante. Se depositan gotas de la suspensión celular homogénea sobre portaobjetos y se extienden en frotis. Una vez se hayan secado al aire, los portaobjetos se tiñen.

Análisis

Los portaobjetos se codifican antes de analizarlos en el microscopio. Se busca la presencia de micronúcleos en, al menos, 1 000 eritrocitos policromaticos por animal.

Para cada animal, se determina la relación entre eritrocitos normocromaticos y policromáticos en un recuento de 1 000 eritrocitos.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tabla. Se registrarán por separado, para cada animal tratado y testigo, el número de eritrocitos policromáticos evaluados y el número de eritrocitos policromáticos con micronúcleos, así como el porcentaje de células micronucleadas y la relación entre eritrocitos normocromáticos y policromáticos. Se registrarán igualmente las medias y las desviaciones típicas para cada lote tratado y para cada lote testigo. Los resultados se evaluarán mediante los métodos estadísticos adecuados.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— especie, cepa y edad de los animales utilizados,

— número de animales de cada sexo de los lotes tratados y de los testigos,

— condiciones de prueba: descripción detallada de los programas de tratamiento y de extracción de muestras, dosis, datos relativos a la toxicidad, testigos negativos y positivos,

— criterios de recuento de los micronúcleos,

— relación dosis-efecto, si es posible,

— signos de toxicidad durante el estudio,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFÍA

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.13. MUTAGENICIDAD (ENSAYO DE MUTACIÓN REVERTIDA EN ESCHERICHIA COLI

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto C).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El sistema de reversión del triptófano de *E. coli* (trp) es un ensayo microbiano que permite medir la reversión $trp^- \rightarrow trp^+$ debida a sustancias químicas que causan sustituciones de bases en el genoma del organismo.

Las bacterias se exponen a las sustancias de ensayo con y sin activación metabólica. Después de un período de incubación adecuado en un medio mínimo, se cuentan las colonias revertidas y se compara el número obtenido con el de las revertidas espontáneamente, observado en un cultivo testigo, no tratado y/o en presencia de disolvente.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El ensayo puede realizarse por los siguientes métodos: i) método de preincubación; y ii) método de incorporación directa, en el que las bacterias y la sustancia de ensayo se mezclan con agar de recubrimiento y se vierten en la superficie de una placa de agar selectivo.

1.6.1. Preparación

1.6.1.1. *Bacterias*

Las bacterias se cultivan a 37 °C hasta el final de la fase exponencial o hasta el principio de la fase estacionaria de crecimiento. La densidad celular aproximada debe ser de 10^8-10^9 células por mililitro.

1.6.1.2. *Activación metabólica*

Las bacterias deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica adecuado. El sistema más frecuentemente utilizado es una fracción postmitocondrial suplementada con cofactores, preparada a partir de hígados de roedores tratados con agentes inductores enzimáticos.

1.6.2. **Condiciones de prueba**

1.6.2.1. *Cepas de prueba*

Deben utilizarse tres cepas: WP2, WP2 uvr A y WP2 uvr A pKM 101. Para la preparación y conservación de los cultivos es conveniente utilizar métodos ampliamente reconocidos. Deben verificarse las exigencias de crecimiento, la identidad genética de las cepas y su sensibilidad a los rayos UV o a la mitomicina C, así como la resistencia a la ampicilina de la cepa WP2 uvr A pKM 101. Asimismo, las cepas deben producir mutaciones revertidas espontáneas en las gamas de frecuencia esperadas.

1.6.2.2. *Medios*

Se utiliza un medio apropiado para la expresión y selección de los mutantes, así como un agar de recubrimiento adecuado.

1.6.2.3. *Utilización de testigos positivos y negativos*

Se deben realizar paralelamente ensayos con testigos no tratados y testigos con el disolvente. También deben realizarse pruebas con testigos positivos con dos fines:

i) confirmar la sensibilidad de las cepas bacterianas.

Pueden utilizarse el metilmetanosulfonato, el óxido de 4-nitroquinolina o la etilnitrosourea como testigos positivos para los ensayos sin activación metabólica;

ii) garantizar la actividad del sistema metabolizante adecuado.

El 2-aminoantraceno constituye un testigo positivo de la actividad de un sistema metabolizante para todas las cepas. Si es posible, es conveniente usar un testigo positivo de la misma clase química que la sustancia de ensayo.

1.6.2.4. *Concentración de sustancia de ensayo por placa*

Por lo menos, deben probarse 5 concentraciones distintas de sustancia de ensayo con diferencias de media unidad semilogarítmica entre placas. Las sustancias se someten a ensayo hasta que se alcancen los límites de solubilidad o de toxicidad. La toxicidad se manifiesta por una reducción del número de mutaciones revertidas espontáneas, por una aclaración de la capa de fondo o por la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. Las sustancias químicas no tóxicas deben probarse hasta los 5 mg por placa antes de que se pueda considerar negativa la sustancia de ensayo.

1.6.2.5. *Condiciones de incubación*

Se incuban las placas entre 48 y 72 horas a 37 °C.

1.6.3. **Procedimiento**

En el método de incorporación directa sobre placa sin activación enzimática, se añaden la sustancia de ensayo y 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco a 2,0 ml de agar de recubrimiento. En los ensayos con activación metabólica se añaden al agar de recubrimiento 0,5 ml de una mezcla de activación de enzimas hepáticas que contenga una cantidad adecuada de fracción postmitocondrial, después de haber incorporado la sustancia de ensayo y las bacterias. Se mezcla el contenido de cada tubo y se vierte sobre la superficie de una placa de agar selectivo. El agar de recubrimiento se deja solidificar y las placas se incuban a 37 °C entre 48 y 72 horas. Al término del período de incubación se cuentan las colonias revertidas en cada placa.

En el método de preincubación, se preincuba una mezcla compuesta por la sustancia de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco y una cantidad adecuada de mezcla de activación de enzimas hepáticas, o la misma cantidad de solución amortiguadora, y luego se le añaden 2,0 ml de agar de recubrimiento. El resto del procedimiento es idéntico al del método de incorporación directa sobre placa.

En los dos métodos las placas se preparan al menos por triplicado.

2. **RESULTADOS**

Se indicará el número de colonias revertidas por placa en todas las series testigo y en las series tratadas. Deben indicarse el recuento por placa, el número medio de colonias revertidas por placa y las desviaciones típicas, tanto para la sustancia de ensayo como para los testigos.

Los resultados deben evaluarse mediante los métodos estadísticos adecuados.

Se realizarán al menos dos pruebas independientes. No es necesario que la segunda se haga de la misma manera que la primera. De hecho, puede ser preferible alterar determinadas condiciones de prueba a fin de obtener datos más útiles.

3. **INFORME**

3.1. **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— bacteria y cepa utilizada,

— condiciones de prueba: dosis, toxicidad, composición del medio, métodos de tratamiento (preincubación, incubación), sistema de activación metabólica, sustancias de referencia, testigos negativos,

— recuento por placa, número medio de colonias revertidas por placa, desviación típica, relación dosis/efecto (si es posible),

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN**

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.14. MUTAGENICIDAD (ENSAYO DE MUTACIÓN REVERTIDA EN SALMONELLA TYPHIMURIUM)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (punto C).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El sistema de reversión de la histidina (his) de *Salmonella typhimurium* es un ensayo microbiano que permite medir la reversión $his^- \rightarrow his^+$ inducida por sustancias químicas causantes de sustituciones de bases o de mutaciones de desplazamiento de la lectura en el genoma del organismo.

Las bacterias se exponen a las sustancias de ensayo con y sin activación metabólica y se cultivan en medio mínimo. Después de un período de incubación adecuado se cuenta el número de colonias revertidas y se compara con el de las revertidas espontáneamente observado en un cultivo testigo no tratado y/o en presencia de disolvente.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Preparación

1.6.1.1. *Bacterias*

Se cultivan las bacterias a 37 °C hasta el final de la fase exponencial o hasta el principio de la fase estacionaria de crecimiento. La densidad celular aproximada debe ser de 10^8 a 10^9 células por mililitro.

1.6.1.2. *Activación metabólica*

Las bacterias deben exponerse a la sustanciz de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más frecuentemente usado es una fracción postmitocondrial suplementada con cofactores, preparada a partir de hígados de roedores tratados con agentes inductores enzimáticos.

1.6.2. Condiciones de ensayo

1.6.2.1. *Cepas de ensayo*

Deberán utilizarse por lo menos cuatro cepas, TA 1535, TA 1537, ó TA 97, TA 98 y TA 100; pueden utilizarse otras cepas suplementarias, por ejemplo, TA 1538 y TA 102. Para la preparación y conservación de los cultivos es conveniente utilizar métodos ampliamente reconocidos. Deben verificarse las exigencias de crecimiento y la identidad genética de las cepas, su sensibilidad a los rayos UV y al cristal violeta, así como su resistencia a la ampicilina. Asimismo, las cepas deben producir mutaciones revertidas espontáneas en las gamas de frecuencia esperadas.

1.6.2.2. *Medios*

Se utiliza un medio selectivo apropiado, así como un agar de recubrimiento adecuado.

1.6.2.3. *Utilización de testigos positivos y negativos*

Se deben realizar paralelamente ensayos con testigos no tratados y testigos con el disolvente. También deben realizarse ensayos con testigos positivos con dos fines:

i) confirmar la sensibilidad de las cepas bacterianas.

Para los ensayos sin activación metabólica pueden utilizarse los compuestos siguientes:

Cepas	Sustancia
TA 1535, TA 100	Azida de sodio
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoreno
TA 1537	9-aminoacridina
TA 102	hidroperóxido de cumeno

ii) garantizar la actividad del sistema metabolizante adecuado.

El 2-aminoantraceno es un testigo positivo de la actividad de un sistema metabolizante para todas las cepas. Si es posible, es conveniente utilizar un testigo positivo que pertenezca a la misma clase química que la sustancia de ensayo.

1.6.2.4. *Cantidad de sustancia de ensayo por placa*

Por lo menos, deben probarse 5 concentraciones distintas de sustancia de ensayo con diferencias de media unidad logarítmica entre ellas. Las sustancias se someten a ensayo hasta que se alcancen los límites de solubilidad o de toxicidad. La toxicidad se manifiesta por una reducción del número de mutaciones revertidas espontáneas, por una aclaración de la capa de fondo o por la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. Las sustancias químicas no tóxicas deben probarse hasta los 5 mg por placa antes de que se pueda considerar negativa la sustancia de ensayo.

1.6.2.5. *Condiciones de incubación*

Se incuban las placas entre 48 y 72 horas a 37 °C.

1.6.3. Procedimiento

En el método de incorporación directa sobre placa sin activación enzimática, se añaden la sustancia de ensayo y 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco a 2,0 ml de agar de recubrimiento. En los ensayos con activación metabólica se añaden al agar de recubrimiento, 0,5 ml de una mezcla de activación de enzimas hepáticas que contenga una cantidad adecuada de fracción postmitocondrial, después de haber incorporado la sustancia de ensayo y las bacterias. Se mezcla el contenido de cada tubo y se vierte sobre la superficie de una placa de agar selectivo. El agar de recubrimiento se deja solidificar y las placas se incuban a 37 °C entre 48 y 72 horas. Al término del período de incubación se cuentan las colonias revertidas en cada placa. En el método de preincubación, se preincuba una mezcla compuesta por la sustancia de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco y una cantidad adecuada de mezcla de activación de enzimas hepáticas, o la misma cantidad de solución amortiguadora, y luego se le añaden 2,0 ml de agar de recubrimiento. El resto del procedimiento es idéntico al del método de incorporación directa sobre placa.

En los dos métodos las placas se preparan, al menos, por triplicado.

2. RESULTADOS

Se indicará el número de colonias revertidas por placa en todas las series testigo y en las series tratadas. Deben indicarse el recuento por placa, el número medio de colonias revertidas por placa y la desviación típica, tanto para la sustancia de ensayo como para los testigos.

Los resultados deben evaluarse mediante los métodos estadísticos adecuados.

Se realizarán al menos dos ensayos independientes. No es necesario que el segundo se haga de la misma manera que el primero. De hecho, puede ser preferible alterar determinadas condiciones de ensayo a fin de obtener datos más útiles.

3. **INFORME**

3.1. **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— bacteria y cepa utilizada,

— condiciones experimentales: dosis, toxicidad, composición del medio, métodos de tratamiento (preincubación, incubación), sistema de activación metabólica, sustancias de referencia, testigos negativos,

— recuento por placa, número medio de colonias revertidas por placa, desviación típica, relación dosis/efecto, (si es posible),

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN**

Véase la introducción general de la parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Véase la introducción general de la parte B (punto E).

B.15. ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS Y DETECCIÓN DE CARCINOGÉNESIS — MUTACIÓN GÉNICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MÉTODO

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Diversas cepas haploides y diploides de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden utilizarse para determinar la producción de mutaciones génicas por agentes químicos con y sin activación metabólica.

Es posible determinar la mutación directa en cepas haploides, en especial mediante la apreciación de la conversión de mutantes rojos consumidores de adenina (ade-1, ade-2) en una forma blanca que la precisa en cantidad doble, así como por sistemas selectivos, como la inducción de resistencia a la canavanina y la cicloheximida.

El método de mutación inversa, el más utilizado, comprende la utilización de la cepa haploide XV 185-14C, portadora de las mutaciones sin sentido ocres ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 y trp 5-48, reversibles mediante mutágenos causantes de sustituciones de bases que induzcan mutaciones en un punto específico o mutaciones supresoras ocres. La cepa XV 185-14C también lleva el marcador his 1-7, una mutación sin sentido invertida principalmente por mutaciones de segundo punto, y el marcador hom 3-10, invertido por mutágenos que desplazan el marco de lectura del código genético (*frameshift mutagens*).

De las cepas diploides de *S. cerevisiae*, la única que se utiliza ampliamente es D_7, homocigota para ilv 1-92.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Se prepararán soluciones de las sustancias químicas estudiadas y las de control inmediatamente antes de la prueba con ayuda de un vehículo apropiado. Cuando se trate de compuestos orgánicos no hidrosolubles, los disolventes orgánicos, como etanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), deberán emplearse en una concentración no superior al 2 % v/v. La concentración final del vehículo no debe influir de modo notable en la viabilidad de las células y en las características de crecimiento.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a las sustancias analizadas en presencia de un sistema de activación metabólica exógena apropiado.

El método de uso más frecuente consiste en añadir la fracción posmitocondrial preparada a partir de hígados de roedores tratados previamente con inductores enzimáticos, a la que se añaden cofactores. También puede considerarse oportuno para la activación metabólica el empleo de especies, tejidos, fracciones posmitocondriales o métodos distintos.

Condiciones del ensayo

Cepas experimentales

La cepa haploide XV 185-14C y la cepa diploide D_7 son las más utilizadas en estudios de mutación génica, pero tambien pueden ser apropiadas otras cepas.

Medios

Se utilizan medios de cultivo apropiados para la determinación del número de supervivientes y mutantes.

Uso de testigos negativos y positivos

Se utilizarán testigos positivos no tratados y tratados con disolventes de modo simultáneo. Es preciso utilizar sustancias químicas de control positivas para cada finalidad de mutación específica.

Concentración de exposición

Se utilizarán, al menos, 5 concentraciones debidamente escalonadas de la sustancia estudiada. En caso de sustancias tóxicas, la concentración máxima probada no reducirá el índice de supervivencias a menos del 5-10 %. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Condiciones de incubación

Las placas se incuban en la oscuridad, a 28-30 ° C, durante 4-7 días.

Frecuencia de mutación espontánea

Se utilizarán subcultivos cuyas frecuencias de mutaciones espontáneas estén dentro de los límites normales admitidos.

Número de repeticiones

Se utilizarán al menos 3 placas por concentración, a fin de determinar los prototrofos producidos por mutación génica, y para observar la viabilidad de las células. Si en los experimentos se emplearan marcadores, como hom 3-10, con tasa de mutaciones baja, puede aumentarse el número de placas utilizadas para lograr datos estadísticamente pertinentes.

Procedimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* suelen tratarse en el curso de una prueba en medio líquido en la que se utilizan células en fase estacionaria o de crecimiento. Las experiencias iniciales deberán realizarse sobre células en crecimiento. Se expone a 1-5 × 10^7 células/ml a la sustancia objeto de estudio durante un período de hasta 18 horas a 28—37 ° C, con agitación de la mezcla; durante el tratamiento, se añade una cantidad adecuada de un sistema de activación metabólica.

Si la primera experiencia da resultados negativos, se procederá a una segunda, en esta ocasión con células en fase estacionaria; si los resultados de la primera fueran positivos, se confirmarán en una experiencia independiente. Al final del tratamiento, las células se centrifugan, lavan y siembran en un medio de cultivo apropiado. Tras la incubación, se examinan las placas para determinar la supervivencia y la inducción de mutaciones génicas.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de colonias contadas, el de mutantes, el índice de supervivencia y la frecuencia de mutantes. Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente. Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— cepa utilizada

— condiciones del ensayo: células en fase estacionaria o de crecimiento, composición de los medios, temperatura y duración de la incubación, sistema de activación metabólica

— condiciones de tratamiento: niveles de exposición, procedimiento y duración del tratamiento, temperatura del tratamiento, controles positivos y negativos

— número de colonias contadas, número de mutantes, supervivencia y frecuencia de mutantes, relación dosis-respuesta si es posible, evaluación estadística de los datos

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.16. RECOMBINACIÓN MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

En *Saccharomyces cerevisiae*, es posible apreciar la recombinación mitótica entre los genes (o, más generalmente, entre un gen y su centrómero) y en el interior de ellos. En el primer caso, se habla de *crossing-over*, generador de intercambios recíprocos, en tanto que, en el segundo los intercambios, casi nunca son recíprocos, y se habla de conversión génica. El *crossing-over* se determina generalmente por la producción de colonias o sectores recesivos homocigotos a partir de una cepa heterocigota, mientras que la conversión génica lo es mediante la producción de inversores prototróficos en una cepa auxotrofa heteroalélica portadora de dos alelos defectuosos distintos del mismo gen. Las cepas de uso más frecuente para descubrir una conversión génica mitótica son D_4 (heteroalélica para ade 2 y trp 5), D_7 (heteroalélica para trp 5), BZ_{34} (heteroalélica para arg 4) y JD1 (heteroalélica para his 4 y trp 5). El *crossing-over* mitótico productor de sectores homocigotos de color rojo y rosa se determina en D_5 o en D_7 (que también sirve para analizar la conversión génica mitótica y la mutación inversa para ilv 1-92), cepas ambas heteroalélicas compelementarias de los alelos ade 2.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripcion del método

Preparativos

Se preparan soluciones de las sustancias químicas estudiadas, y de los compuestos de control y de referencia, inmediatemente antes del ensayo, con ayuda de un vehículo apropiado. Cuando se trate de compuestos orgánicos no hidrosolubles, los disolventes orgánicos como etanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), deberán emplearse en una concentración no superior el 2 % v/v. La concentración final del vehículo no debe influir de modo notable en la viabilidad de las células ni en las características de crecimiento.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a las sustancias analizadas en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena apropiado. El método de uso más frecuente consiste en añadir a la fracción posmitocondrial preparada a partir de hígados de roedores tratados previamente con inductores enzimáticos, a la que se añaden cofactores. También puede considerarse oportuno para la activación metabólica el empleo de especies, tejidos, fracciones posmitocondriales o métodos distintos.

Condiciones del ensayo

Cepas experimentales

Las cepas que se utilizan con más frecuencia son las diploides D_4, D_5, D_7 y JD1, pero también pueden considerarse apropiadas otras.

Medios

Se utilizan medios de cultivo apropiados para la determinación de la supervivencia y de la frecuencia de recombinacion mitótica.

Uso de testigos negativos y positivos

Se utilizarán testigos positivos no tratados y tratados con disolvente de modo simultáneo. Es preciso utilizar sustancias químicas de control positivas apropiadas para cada finalidad de recombinación específica.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán, al menos, cinco concentraciones debidamente escalonadas de la sustancia estudiada. Entre los factores que deben tenerse en cuenta figuran la citotoxicidad y la solubilidad. La concentración mínima no debe influir en modo alguno en la viabilidad celular. En casos de sustancias tóxicas, la concentración máxima probada no reducirá el índice de supervivencia a menos del 5-10 %. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Las células pueden exponerse a las sustancias estudiadas en la fase estacionaria o durante el crecimiento hasta completar periodos de 18 horas, como máximo. No obstante, si se utilizan periodos de tratamiento largos, hay que examinar al microscopio los cultivos por si aparecieran esporas, ya que su presencia invalidaría la prueba.

Condiciones de incubación

Las placas se incuban en la oscuridad, a 28-30 °C, durante cuatro o siete días. Las placas que se utilicen para la determinación de los sectores homocigotos rojo y rosa producidos por *crossing-over* mitótico se conservarán en frigorífico a ± 4 °C durante uno o dos días más antes de la evaluación, a fin de que pueda intensificarse la pigmentación de las colonias de interés.

Frecuencia de recombinaciones mitóticas espontáneas

Se utilizarán subcultivos cuyas frecuencias de recombinaciones mitóticas espontáneas estén dentro de los límites normales admitidos.

Número de repeticiones

Se sembrarán al menos tres placas por concentración para determinar tanto la viabilidad como el número de protocrofos producidos por conversión génica mitótica. En caso de determinación de homocigosis recesiva producida por *crossing-over* mitótico, se aumentará el número de placas para obtener un número adecuado de colonias.

Procedimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* suelen tratarse en el curso de una prueba en medio líquido en la que se utilizan células en fase estacionaria o de crecimiento. Las experiencias iniciales deberán realizarse sobre células en crecimiento. Se expone a 1-5 × 10^7 células/ml a la sustancia objeto de estudio durante un periodo de hasta 18 horas a 28-37 °C, con agitación de la mezcla; durante el tratamiento, se añade, si procede, una cantidad adecuada de un sistema de activación metabólica.

Al final del tratamiento, las células se centrifugan, lavan y siembran en un medio de cultivo apropiado. Tras la incubación se examinan las placas para determinar la supervivencia y la inducción de recombinación mitótica.

Si la primera experiencia da resultados negativos, se procederá a una segunda, en esta ocasión con células en fase estacionaria; si los resultados de la primera fueran positivos, se confirmarán en una experiencia independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de colonias contadas, el de recombinantes, el índice de supervivencia y la frecuencia de recombinantes.

Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— cepa utilizada

— condiciones del ensayo: células en fase estacionaria o de crecimiento, composición de los medios, temperatura y duración de la incubación, sistema de activación metabólica

— condiciones del tratamiento: niveles de exposición, procedimiento y duración del tratamiento, temperatura del tratamiento; controles positivos y negativos

— número de colonias contadas, número de recombinantes, supervivencia y frecuencia de recombinación, relación dosis-respuesta si es posible, evaluación estadística de los datos

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.17. MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Pueden utilizarse sistemas de cultivo de células de mamífero para descubrir mutaciones provocadas por sustancias químicas. Entre las líneas celulares de mayor uso figuran las células de linfoma de ratón L5178Y y las líneas celulares CHO y V-79 del hámster chino. En estas líneas celulares, los sistemas de uso más común determinan las mutaciones en los loci de la timidinquinasa (TK), la hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) (1) y la Na^+/K^+ ATPasa. Los sistemas mutacionales TK y HPRT revelan mutaciones de pares de bases, mutaciones por desplazamiento del marco de lectura del código genético *(frameshift mutations)* y delecciones pequeñas por su parte, el sistema Na^+/K^+ sólo descubre las mutaciones de pares de bases.

Las células deficientes en timidinquinasa (TK) a causa de la mutación directa TK^+/TK^- son resistentes a la bromodeoxiuridina (BrdU), a la fluorodesoxiuridina (FdU) o a la trifluorotimidina (TFT), ya que estos antimetabolitos no son incorporados a los nucleótidos celulares por la timidinquinasa del sistema enzimático de «salvamento»; los nucleótidos necesarios para el metabolismo celular sólo se obtienen mediante síntesis *de novo*. No obstante, en presencia de timidinquinasa, se incorporan a los nucleótidos BrdU, FdU o TFT, con las consiguientes inhibición del metabolismo celular y citotoxicidad. Así pues, las células mutantes proliferan en presencia de BrdU, FdU o TFT, al contrario que las normales, que contienen timidinquinasa. De igual modo, las células deficitarias en HPRT son seleccionadas por resistencia a la 8-azaguanina (AG) o a la 6-tioguanina (TG). Las células con Na^+/K^+ ATPasa alterada se seleccionan por resistencia a la cuabaina.

La citotoxicidad se averigua determinando el efecto de la sustancia estudiada sobre la capacidad para formar colonias (eficacia de clonado) o los índices de crecimiento de los cultivos. La frecuencia de mutantes se establece mediante la siembra de un número conocido de células en un medio que contenga agente selectivo para descubrir las células mutantes, y en un medio que no lo contenga para determinar las células supervivientes. Tras un período de incubación apropiado, se cuentan las colonias. Las frecuencias de mutantes se calculan a partir del número de colonias mutantes, y en función del índice de supervivencia celular.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Células

Pueden utilizarse para este ensayo líneas celulares diversas, entre las que cabe citar los subclones de L5178Y, las células CHO o V-79, con sensibilidad demostrada a los mutágenos químicos, gran eficacia de clonado y frecuencia de mutación espontánea escasa. Pueden examinarse periódicamente las células empleadas para comprobar la estabilidad del cariotipo y la inexistencia de contaminación por mycoplasma. Es posible recurrir a otros tipos celulares, siempre que esté perfectamente comprobada su validez para poner de manifiesto mutaciones génicas inducidas por vía química.

(1) Antes HGPRT.

Medio

Se utilizarán medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (p. ej., temperatura, recipientes de cultivo, concentraciones de CO_2 y humedad). Medios y sueros se elegirán en función de los sistemas selectivos y el tipo celular empleados en el ensayo.

Sustancia estudiada

Las sustancias analizadas pueden prepararse en los medios de cultivo, o disolverse o suspenderse en vehículos apropiados antes de tratar las células. La concentración final del vehículo en el sistema de cultivo no debe influir en la viabilidad ni en el índice de crecimiento de las células.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a la sustancia analizada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena de mamífero apropiado. Cuando se utilicen tipos celulares con actividad metabólica intrínseca, deberá tenerse la certeza de que el índice y la naturaleza de la actividad son adecuados para la clase química objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Uso de controles negativos y positivos

Se iniciarán en cada experimento controles positivos, utilizando una sustancia de acción directa y otra que precise activación metabólica; se empleará asimismo un control negativo (vehículo).

A continuación damos ejemplos de sustancias que pueden utilizarse como controles positivos:

— compuestos de acción directa:
  — etilmetanosulfonato
  — hicantona
— compuestos de acción indirecta:
  — 2-acetilaminofluoreno
  — 7,12-dimetilbenzantraceno
  — N-nitrosodimetilamina.

Si se considera oportuno, se incluirá un control positivo extra perteneciente a la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán varias concentraciones de la sustancia estudiada. Las empleadas deben provocar un efecto tóxico relacionado con la concentración; la concentración máxima originará una supervivencia escasa, y la mínima, una supervivencia semejante a la observada en el control negativo.

Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias tóxicas claramente hidrosolubles, la concentración máxima se determinará en cada caso.

Procedimiento

El número de células utilizadas por cultivo debe estar en relación con la frecuencia de mutaciones espontáneas; la regla general consiste en emplear un número de células viables igual a diez veces la inversa de la frecuencia de mutaciones espontáneas.

Las células se expondrán durante un período suficiente, que en la mayoría de los casos será de 2-5 horas. Las células que no tengan actividad metabólica intrínseca suficiente se expondrán a la sustancia objeto de estudio en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia estudiada, y se someten luego a cultivo para determinar la viabilidad y permitir la expresión del fenotipo mutante.

Al terminar el período de expresión, que será suficiente para permitir una expresión fenotípica casi óptima de los mutantes inducidos, se cultivan las células en un medio, con agentes selectivos (y sin ellos), para determinar tanto el número de mutantes como la viabilidad.

Todos los resultados se confirman en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se expondrán en forma de tablas en las que aparezcan los recuentos por placa, para la sustancia estudiada y los controles, en lo que respecta a la inducción de mutación y a la supervivencia. Se indicarán también el número medio de colonias por placa y la desviación estándar. La frecuencia de mutación se expresará como número de mutantes por número de células supervivientes. El índice de supervivencia y las eficacias de donado se expresan en porcentaje del valor control.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— línea celular utilizada, número de cultivos celulares, métodos de mantenimiento de los cultivos celulares
— condiciones de ensayo: composición de los medios, concentración de CO_2, concentración de la sustancia estudiada, vehículo usado, temperatura de incubación, período de incubación, longitud del período de expresión (incluido el número de células sembradas, los subcultivos y los programas de aporte nutritivo, si procede), duración del tratamiento, densidad celular durante él, tipo de sistema de activación metabólica de mamífero utilizado, controles positivo y negativo, agente selectivo utilizado
— justificación de la elección de las dosis
— método empleado para enumerar las células viables y mutantes
— evaluación estadística
— comentario de los resultados
— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.18. LESIÓN Y REPARACIÓN DE DNA — SÍNTESIS DE DNA NO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El ensayo de síntesis no programada de DNA (UDS) mide la síntesis de reparación del DNA tras escisión y eliminación de un fragmento de DNA que contiene la región lesionada por agentes químicos y físicos. Se basa en la incorporación de timidina tritiada (^{3}H-TdR) al DNA de células de mamífero que no se encuentren en la fase S del ciclo celular. Es posible determinar la captación de ^{3}H-TdR mediante el examen del DNA procedente de células tratadas por autorradiografía o recuento en centelleo líquido (LSC): Las células de mamífero en cultivo, salvo si se utilizan hepatocitos primarios de rata, se tratan con la sustancia objeto de estudio con un sistema de activación metabólica exógeno y sin él. También es posible determinar la UDS por métodos *in vivo*.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripcion del método

Preparativos

Las sustancias químicas analizadas y las de control o referencia se prepararán en un medio de crecimiento, o se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados, para diluirse luego aún más en un medio de cultivo antes de utilizarse en el ensayo. La concentración final del vehículo no debe influir en la viabilidad celular.

Pueden utilizarse para este ensayo cultivos primarios de hepatocitos de rata, linfocitos humanos o líneas celulares establecidas (p. ej., fibroblastos humanos diploides).

Las células se expondrán a la sustancia química estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado.

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

Son necesarios, para cada punto experimental, al menos dos cultivos celulares para la autorradiografía y seis (o menos, si está justificado científicamente) para el recuento en centelleo líquido.

Uso de testigos negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento controles positivos y negativos (no tratados, con vehículo o ambos) simultáneos, con activación metabólica y sin ella.

Son ejemplos de controles positivos para la prueba con hepatocitos de ratas el 7,12-dimetilbenzantraceno (7,12-DMBA) o el 2-acetilaminfluoreno (2-AAF). En el caso de líneas celulares establecidas, el 4-NQO (4-nitriquinolina-N-óxido) es un ejemplo de control positivo para los ensayos por autorradiografía y LSC realizados sin activación metabólica; cuando se emplean sistemas de activación metabólica, un ejemplo de compuesto de control positivo sería la N-dimetilnitrosamina.

Concentraciones de exposición

Se utilizará una gama de concentraciones de la sustancia estudiada que permita determinar la respuesta de modo óptimo. La concentración máxima debe producir ciertos efectos citotóxicos. Los compuestos relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Células

Para mantener los cultivos, se utilizarán medios de crecimiento, concentraciones de CO_2 y temperatura y humedad apropiados. Las líneas celulares establecidas se examinarán periódicamente para comprobar si existe contaminación por mycoplasma.

Activación metabólica

En los cultivos primarios de hepatocitos no se utiliza ningún sistema de activación metabólica. Por su parte, las líneas celulares establecidas y los linfocitos se exponen a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado.

Procedimiento

Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas, derivadas de cultivos madre (p. ej., por tripsinización o agitación) se siembran con la densidad adecuada en recipientes de cultivo y se incuban a 37° C.

Se establecen cultivos a corto plazo de hepatocitos de rata permitiendo a hepatocitos recién disociados en un medio apropiado fijarse a la superficie de crecimiento.

Los cultivos de linfocitos humanos se establecen por medio de técnicas apropiadas.

Tratamiento de los cultivos con la sustancia estudiada

Hepatocitos primarios de rata

Los hepatocitos de ratas recién aisladas se tratan con la sustancia estudiada, en un medio que contenga ^{3}H-TdR, durante un período de tiempo apropiado. Al final de éste, se eliminará el medio, y se aclararán, fijarán y secarán las células. Las preparaciones se sumergen en una emulsión autorradiográfica (también cabe utilizar película fotográfica), se exponen, se revelan, se tiñen y se cuentan.

Líneas celulares establecidas y linfocitos

Técnicas autorradiográficas: Los cultivos celulares se exponen a la sustancia estudiada durante períodos de tiempo adecuados, y se tratan después con ^{3}H-TdR. El plazo de exposición dependerá de la naturaleza de la sustancia, de la actividad del sistema metabólico y del tipo de células. Para apreciar el pico de UDS, se añadirá ^{3}H-TdR al mismo tiempo que la sustancia analizada o en los pocos minutos posteriores a su exposición. La elección de una u otra de estas técnicas vendrá determinada por posibles interacciones entre la sustancia y la ^{3}H-TdR. Para distinguir esta última se utiliza, por ejemplo, un medio deficitario en arginina, un contenido de suero bajo o la adición de hidroxiurea al medio de cultivo.

Determinaciones de la UDS por LSC: Antes de proceder al tratamiento con la sustancia objeto de estudio, se bloqueará la entrada de las células en la fase S del modo antes indicado; a continuación, se expone a las células a la sustancia tal como se describe para la autorradiografía. Al final del período de incubación, se extrae el DNA de las células y se determinan el contenido total de DNA y el grado de incorporación de ^{3}H-TdR.

Hay que señalar que cuando se utilicen linfocitos humanos en las técnicas expuestas no es necesario suprimir la replicación semiconservadora de DNA en cultivos no estimulados.

Análisis

Determinaciones autorradiográficas

Para determinar la UDS en células en cultivo, no se cuentan los núcleos en fase S. Se contarán por lo menos 50 células por concentración. Las preparaciones recibirán un código antes del recuento. Se contarán en cada una de ellas varios campos, elegidos al azar y lo bastante alejados entre sí. Se determinará la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada al citoplasma mediante el recuento de tres superficies del tamaño del núcleo en el citoplasma de cada célula contada.

Determinación por LSC

En las determinaciones de la UDS por LSC debe utilizarse un número adecuado de cultivos para cada concentración y en los controles.

Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

2.1. Determinaciones autorradiográficas

Se registrarán por separado la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada al citoplasma y el número de granos encontrados sobre el núcleo celular.

Pueden utilizarse la media, la mediana y el modo para describir la distribución de la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada en el citoplasma, así como el número de granos por núcleo.

2.2. Determinaciones por LSC

Para las determinaciones por LSC, se indicará la incorporación de ^{3}H-TdR en forma de dpm/µg de DNA. Puede utilizarse la media de dmp/µg de DNA, con su desviación estándar, para describir la distribución de la incorporación.

Los datos se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— células utilizadas, densidad y número de pases en el momento del tratamiento, número de cultivos celulares

— métodos utilizados para el mantenimiento de los cultivos celulares, incluidos medio, temperatura y concentración de CO_2

— sustancia estudiada, vehículo, concentraciones y justificación de la elección de las concentraciones empleadas en el ensayo

— detalles sobre los sistemas de activación metabólica

— programa de tratamiento

— controles positivos y negativos

— técnica autorradiográfica utilizada

— métodos empleados para bloquear la entrada de las células en la fase S

— técnicas utilizadas para extraer el DNA y determinar la cantidad total de DNA en la determinación por LSC

— relación dosis-respuesta, si es posible

— evaluación estadística

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.19. ENSAYO *IN VITRO* DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El ensayo de intercambio de cromátidas hermanans (SCE) es una prueba a corto plazo encaminada a descubrir intercambios recíprocos de DNA entre 2 cromátidas hermanas de un cromosoma de desdoblamiento. Los SCE representan el intercambio recíproco de productos de replicación del DNA en loci aparentemente homólogos. Es probable que el proceso de intercambio comprenda la rotura y la reunión del DNA, aunque se sabe poco sobre su base molecular. Para descubrir los SCE, es necesario poder marcar de forma diferente las cromátidas hermanas, cosa que se consigue mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) al DNA cromosómico durante dos ciclos celulares.

Se exponen células de mamífero *in vitro* a la sustancia objeto de estudio en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena de mamífero, si procede, y se cultivan durante dos ciclos de replicación en un medio que contenga BrdU. Después del tratamiento con un inhibidor del huso (p. ej., colchicina) para acumular las células en fase de mitosis de tipo metafásico (c-metafase), se recolectan las células y se realizan preparaciones de cromosomas.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

— Pueden utilizarse en el ensayo cultivos primarios (linfocitos humanos) o líneas celulares establecidas (p. ej., células ováricas de hamster chino). Las líneas celulares se controlarán en busca de una posible contaminación por mycoplasma.

— Se utilizarán medios de cultivo y condiciones de incubación (p. ej., temperatura, recipientes de cultivo, concentración de CO_2 y humedad) adecuados.

— Las sustancias estudiadas pueden prepararse en medios de cultivo, o disolverse o suspenderse en vehículos apropiados, antes del tratamiento de las células. La concentración final de un vehículo en el sistema de cultivo no debe influir de modo notable en la viabilidad ni en el índice de crecimiento de las células, y los efectos sobre la frecuencia de SCE se controlarán con ayuda de un control del disolvente.

— Las células se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógeno de mamífero. Por otro lado, cuando se utilicen tipos de células con actividad metabólica intrínseca, el grado y la naturaleza de la actividad deben ser apropiados para la clase química objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

Para cada ensayo, se utilizarán dos cultivos separados, por lo menos.

Uso de controles positivos y negativos

Deben incluirse en cada experimento controles positivos en los que se utilicen una sustancia con acción directa y otra que precisa activación metabólica; también ha de utilizarse un control para el vehículo.

A continuación facilitamos ejemplos de sustancias que pueden utilizarse como controles positivos:

— compuesto de acción directa: etilmetanosulfonato

— compuesto de acción indirecta: ciclofosfamida.

En caso oportuno, puede incluirse un control positivo complementario de la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán al menos tres concentraciones de la sustancia objeto de estudio, escalonadas debidamente. La concentración máxima producirá un efecto tóxico significativo, pero no impedirá una replicación celular adecuada. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad por métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Procedimiento

Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas, derivadas de cultivos madre (p. ej., por tripsinización o agitación), se siembran con la densidad adecuada en recipientes de cultivo y se incuban a 37° C. En los cultivos de una sola capa celular, el número de células por recipiente de cultivo debe ajustarse de modo que los cultivos no confluyan en más del 50 % en el momento de la recogida. También es posible utilizar las células en forma de un cultivo en suspensión. Los cultivos de linfocitos humanos se preparan a partir de sangre heparinizada por medio de técnicas apropiadas, y se incuban a 37° C.

Tratamiento

Se expone a células en fase de crecimiento exponencial a la sustancia analizada durante un período de tiempo apropiado; en la mayoría de los casos pueden bastar una o dos horas, pero en determinadas circunstancias puede prolongarse el período de tratamiento hasta abarcar dos ciclos celulares completos. Las células sin actividad metabólica intrínseca deben exponerse a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia estudiada y se cultivan en presencia de BrdU durante dos ciclos de replicación. Otro método consiste en exponer simultáneamente las células a la sustancia y BrdU durante dos ciclos celulares completos.

Los cultivos de linfocitos humanos se tratan mientras se encuentran en un estado semisincrónico.

Las células se examinan en su segunda división tras el tratamiento, con lo que se garantiza la exposición de las fases más sensibles del ciclo celular a la sustancia estudiada. Todos los cultivos a los que se añada BrdU se manipularán en la oscuridad o con iluminación débil de lámparas incandescentes hasta la recolección de las células, a fin de reducir la fotolisis del DNA que contenga BrdU.

Recolección de las células

Los cultivos celulares se tratan con un inhibidor del huso (p. ej., colchicina) de 1 a 4 horas antes de la recolección. Cada cultivo se recolecta y trata por separado para la preparación de los cromosomas.

Preparación y teñido de los cromosomas

Las preparaciones de cromosomas se realizan por métodos citogenéticos estándar. Existen varias técnicas para teñirlos de forma que se aprecien los SCE (p. ej., el método de fluorescencia con Giemsa).

Análisis

El numero de células analizadas dependerá de la frecuencia espontánea de control de SCE. Por lo general, se analizan al menos 25 metafases bien escalonadas por cultivo para contar los SCE. Las preparaciones reciben un código antes del análisis. En linfocitos humanos, sólo se analizan las metafases que contienen 46 centrómeros. En las líneas celulares establecidas, sólo se analizan las metafases que contienen ± 2 centrómeros del número modal. Se precisará si una inversión del marcado en el centrómero se considera SCE. Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas. El número de SCE para cada metafase y el de SCE por cromosoma han de facilitarse por separado para todos los cultivos tratados y de control. Los resultados se analizarán por métodos estadísticos adecuados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— células utilizadas, métodos de mantenimiento del cultivo celular

— condiciones del ensayo: composición de los medios, concentración de CO_2, concentración de la sustancia estudiada, vehículo empleado, temperatura de incubación, período de tratamiento, inhibidor del huso utilizado, su concentración y duración del tratamiento con él, tipo de sistema de activacion de mamífero utilizado, controles positivos y negativos

— número de cultivos celulares por ensayo

— detalles de la técnica utilizada para la preparación de las extensiones

— número de metafases analizadas (datos facilitados por separado para cada cultivo)

— número medio de SCE por célula y por cromosoma (datos facilitados por separado para cada cultivo)

— criterio de recuento de los SCE

— justificación de la elección de las dosis

— relación dosis-respuesta, si es posible

— evaluación estadística

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.20. ENSAYO DE LETALIDAD RECESIVA LIGADA AL SEXO EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La prueba de letalidad recesiva ligada al sexo (SLRL) practicada con *Drosophila melanogaster* descubre la aparición de mutaciones (lo mismo mutaciones puntuales que pequeñas deleciones) en la línea germinal del insecto. Se trata de un análisis de mutación capaz de descubrir mutaciones en unos 800 loci de cromosoma X, lo que supone alrededor del 80 % del total de loci existentes. El cromosoma X supone aproximadamente una quinta parte del genoma haploide completo.

Las mutaciones del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* se expresan fenotípicamente en los machos portadores del gen mutante. Cuando la mutación es letal en el estado hemicigoto, se deduce su presencia por la falta de uno de los grupos de descendencia masculina de los dos producidos normalmente por una hembra heterocigota. La prueba SLRL aprovecha estas circunstancias por medio de cromosomas marcados especialmente y con reordenaciones de su estructura.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Animales de experimentación

Pueden utilizarse machos de un linaje de tipo salvaje bien definido, y hembras de linaje Muller-5. También cabe emplear otros linajes de hembras debidamente marcadas con cromosomas X invertidos de manera múltiple.

Sustancia objeto de estudio

Las sustancias estudiadas se disuelven en agua. Las que sean insolubles en agua pueden disolverse o suspenderse en vehículos apropiados (p. ej., una mezcla de etanol y Tween-60 u 80), para diluirse luego en agua o solución salina antes de la administración. Se evitará el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo.

Número de animales

Se determinarán previamente la sensibilidad y la potencia de la prueba. La frecuencia de mutantes espontáneos observada en el control apropiado influirá intensamente en el número de cromosomas tratados que deba analizarse.

Vía de administración

La exposición puede ser oral, por inyección o por exposición a gases o vapores. La sustancia objeto de estudio puede administrarse en una solución azucarada. Cuando sea necesario, pueden disolverse las sustancias en una solución de ClNa al 0,7 % e inyectarlas así en el tórax o el abdomen.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán controles negativos (vehículo) y positivos. No obstante, si el laboratorio dispone de datos de controles publicados adecuados, no son necesarios controles simultáneos.

Niveles de exposición

Se utilizarán tres niveles de exposición. Para una evaluación preliminar, puede utilizarse un solo nivel de exposición de la sustancia analizada, que corresponderá a la concentración máxima tolerada o a la que produzca ciertos signos de toxicidad. Cuando se trate de sustancias atóxicas, ha de utilizarse la exposición en la concentración máxima posible.

Procedimiento

Se tratan machos de fenotipo salvaje (de tres a cinco días de edad) con la sustancia objeto de estudio y se aparean individualmente con varias hembras vírgenes del linaje Muller-5, o de otro debidamente marcado (con cromosomas invertidos de manera múltiple). Las hembras se sustituyen por vírgenes nuevas cada dos o tres días para cubrir el ciclo germinal completo. Se examina luego la descendencia de estas hembras para apreciar los efectos letales correspondientes a los efectos sobre el esperma maduro, las espermátidas en estadios precoces, medios y tardíos, los espermatocitos y los espermatogonios en el momento del tratamiento.

Las hembras F_1 heterocigotas procedentes de los cruces anteriores se aparean individualmente (es decir, una hembra por vial) con sus hermanos. En la generación F_2, se examina cada cultivo para descubrir la ausencia de machos del tipo salvaje. Si un cultivo parece proceder de una hembra F_1 portadora de un gen letal en el cromosoma X paterno (es decir, no se observa ningún macho portador del cromosoma tratado), se pondrán a prueba las hijas de esta hembra que presenten el mismo genotipo para comprobar si la letalidad se repite en la generación siguiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que se consignen el número de cromosomas estudiados, el de machos infértiles y el de cromosomas letales en cada concentración de exposición y en cada periodo de apareamiento, para cada macho tratado. Se indicará el número de grupos de tamaños diferentes por macho. Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Se utilizarán métodos estadísticos apropiados para evaluar el ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo. El reagrupamiento de genes letales recesivos procedentes de un solo macho se tendrá en cuenta y se evaluará por un método estadístico adecuado.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— linajes o cepas de *Drosophila* empleados, edad de los insectos, número de machos tratados, número de machos estériles, número de cultivos F_2 establecidos, número de cultivos F_2 sin progenie, número de cromosomas portadores de un gen letal encontrado en cada estadio de la célula germinal

— criterios adoptados para determinar el tamaño de los grupos tratados

— condiciones de la prueba: descripción detallada del programa de tratamiento y muestreo, niveles de exposición, datos de toxicidad, controles negativos (disolvente) y positivos si procede

— criterios de recuento de las mutaciones letales

— relación exposición/efecto, si es posible

— evaluación de los datos

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.21. ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CELULAS DE MAMIFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Es posible utilizar sistemas de cultivo de células de mamífero para descubrir modificaciones fenotípicas in vitro inducidas por sustancias químicas asociadas con transformación maligna in vivo. Entre las células de uso más frecuente figuran C3H10T½, 3T3, SHE, rata Fisher; las pruebas se basan en modificaciones de la morfología celular, la formación de focos o modificaciones vinculadas con el crecimiento o no en agar semisólido. Existen sistemas, empleados con menor frecuencia, que ponen de manifiesto otras alteraciones fisiológicas o morfológicas en las células tras exposición a sustancias químicas carcinogénicas. Ninguno de los criterios analizados en estas pruebas *in vitro* tiene una relación de mecanismo establecida con el cáncer. Algunos de los sistemas de prueba son capaces de descubrir promotores tumorales. Puede determinarse la citotoxicidad averiguando el efecto de la sustancia estudiada sobre la capacidad de formación de colonias (eficacia de clonado) o los índices de crecimiento de los cultivos. La determinación de la citotoxicidad tiene por objeto establecer si la exposición a la sustancia analizada ha sido toxicológicamente significativa, pero no permite calcular la frecuencia de transformaciones en todas las pruebas, dado que en algunas de éstas pueden ser necesarias una incubación prolongada, una nueva siembra o ambas.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripcion del método

Preparativos

Células

Según la prueba de transformación que se realice, pueden utilizarse líneas celulares o células primarias diversas. El investigador se encargará de que las células que se empleen presenten la modificación fenotípica apropiada tras exposición a sustancias carcinogénicas conocidas, y de que la fiabilidad y la validez de la prueba efectuada en su laboratorio estén contrastadas por datos documentados.

Medio

Se utilizarán medios y condiciones experimentales apropiados para la prueba de transformación elegida.

Sustancia objeto de estudio

Las sustancias puestas a prueba pueden prepararse en medios de cultivo, disolverse o suspenderse en vehículos apropiados antes de tratar las células. La concentración final del vehículo en el medio de cultivo no influirá en la viabilidad de las células, el índice de crecimiento ni en la incidencia de transformación.

Actividad metabólica

Las células se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica de mamífero apropiado. Cuando se utilicen tipos celulares con actividad metabólica intrínseca, deberá saberse si la naturaleza de la actividad es apropiada para la clase química analizada.

Condiciones del ensayo

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento controles positivos a base de una sustancia de acción directa y otra que precise activación metabólica; también se utilizará un control negativo (vehículo).

A continuación se ofrecen ejemplos de sustancias que pueden emplearse como controles positivos:

— Compuestos de acción directa:
  — etilmentanosulfonato
  — β-propiolactona
— Compuestos que precisan activación metabólica:
  — 2-acetilaminofluoreno
  — 4-dimetilaminoazobenceno
  — 7,12-dimetilbenzantraceno

Cuando se juzgue oportuno, se incluirá un control positivo complementario perteneciente a la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán varias concentraciones de la sustancia objeto de estudio, que producirán un efecto tóxico acorde con su potencia; así, la concentración máxima provocará una supervivencia escasa, mientras que la supervivencia con la concentración mínima será aproximadamente igual a la encontrada en el control negativo. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad por medio de métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta de la sustancia estudiada se determinará en cada caso.

Procedimiento

Las células deben exponerse durante un periodo de tiempo adecuado, que dependerá del sistema celular utilizado; por tanto, quizá sea necesario un nuevo tratamiento, acompañado de un cambio de medio (y, en caso preciso, de una nueva mezcla de activación metabólica), si la exposición es prolongada. Las células carentes de actividad metabólica intrínseca suficiente se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del periodo de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia analizada y se cultivan en condiciones que permitan la aparición del fenotipo transformado en estudio; se determina también la incidencia de esta transformación. Todos los resultados se confirman en un experimento independiente.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas que recogerán datos diversos según el método que se utilice, como, por ejemplo, recuentos por placa, placas positivas o número de células transformadas. Cuando proceda, se expresará el índice de supervivencia en porcentaje de los índices de control y frecuencia de transformación a modo del número de células transformadas frente al de supervivientes. Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— tipo de célula utilizado, número de cultivos celulares, métodos de mantenimiento de los cultivos celulares

— condiciones del ensayo; concentración de la sustancia estudiada, vehículo utilizado, periodo de incubación, duración y frecuencia del tratamiento, densidad celular durante el tratamiento, tipo de sistema de activación metabólica exógena utilizado, controles positivos y negativos, especificación del fenotipo estudiado, sistema selectivo empleado (si procede), justificación de la elección de las dosis

— método utilizado para contar las células viables y transformadas

— evaluación estadística

— discusión de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.22. ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La letalidad dominante provoca la muerte del embrión o feto. Su inducción por exposición a una sustancia química indica que ésta ha alterado el tejido embrionario de la especie estudiada. Se admite generalmente que la letalidad dominante se debe a una lesión cromosómica (anomalías estructurales y numéricas). Si los animales tratados son hembras, la muerte del embrión también puede deberse a efectos tóxicos.

En general, los machos se exponen a la sustancia objeto de estudio y se aparean con hembras vírgenes no tratadas. Es posible investigar por separado los distintos estadios de las células embrionarias gracias al empleo de intervalos de apareamiento sucesivos. Un número de implantes muertos por hembra, en el grupo tratado, superior al observado en el grupo de control, es reflejo de las pérdidas tras la implantación. Por otro lado, es posible calcular las pérdidas antes de ella mediante recuento de los cuerpos lúteos, o por comparación entre número total de implantes por hembra en los grupos tratados y los de control. El efecto total de letalidad dominante es igual a la suma de las pérdidas antes y después de la implantación. El cálculo de tal efecto se basa en la comparación del número de implantes vivos por hembra, en el grupo de prueba, en relación con el registrado para el grupo de control. Una reducción del número de implantes en determinados intervalos puede deberse a destrucción de células (es decir, de espermatocitos, espermatogonios o ambos).

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias objeto de estudio se disolverán o suspenderán en solución salina isotónica. Las sustancias químicas insolubles en agua pueden disolverse o suspenderse en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no alterará el compuesto estudiado ni producirá efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Vía de administración

En general, la sustancia estudiada sólo debe administrarse una vez, aunque cabe utilizar un programa de tratamiento reiterado si lo aconseja la información toxicológica disponible. Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal. Pueden ser apropiadas otras vías de administración.

Animales de experimentación

Se recomienda utilizar ratas o ratones, jóvenes y en plena madurez sexual, que se distribuirán al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

Número y sexo

Se utilizará un número apropiado de machos tratados, teniendo en cuenta la frecuencia espontánea del carácter biológico evaluado según la cepa empleada. El número elegido se basará en la sensibilidad de detección y el grado de significación, determinados previamente. Por ejemplo, en un experimento tipo, el número de machos en cada grupo posológico deberá ser suficiente para obtener alrededor de 30 a 50 hembras grávidas por periodo de apareamiento.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán simultaneamente en cada experimento controles positivos y negativos (vehículos). Cuando se disponga de resultados aceptables obtenidos con controles positivos en experimentos recientes en el mismo laboratorio, podrán emplearse en lugar de un control positivo simultáneo. En lo que respecta a las sustancias de control positivas, se utilizará una dosis baja apropiada (p. ej., MMS, intraperitonalmente, 10 mg/kg) para demostrar la sensibilidad de la prueba.

Dosis

Normalmente, se utilizan tres niveles posológicos. La dosis alta producirá signos de toxicidad o reducirá la fecundidad de los animales tratados. En determinados casos, puede bastar un solo nivel posológico alto.

Prueba de límite

Las sustancias atóxicas se estudian en concentración de 5 g/kg en caso de administración única, y de 1 g/kg/día en caso de administración reiterada.

Procedimiento

Hay varios esquemas de tratamiento posibles. El método más frecuente es el de la administración única, pero pueden utilizarse otros.

Cada macho se aparea de forma secuencial con 1 ó 2 hembras vírgenes no tratadas, a intervalos de tiempo apropiados tras el tratamiento. Las hembras se mantendrán con los machos durante al menos un ciclo estral completo o hasta que se compruebe el apareamiento por la presencia de esperma en la vagina o por la existencia de tapón vaginal.

El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de tratamiento, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de células embrionarias tras el tratamiento.

Las hembras se sacrifican en la segunda mitad de la gestación para examinar el contenido de su útero y determinar el número de implantes vivos y muertos. Pueden inspeccionarse los ovarios para averiguar el número de cuerpos lúteos.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de machos, el de hembras grávidas y el de hembras no grávidas. Se facilitarán por separado los resultados de cada apareamiento, incluida la identidad de cada macho y hembra. Se recogerán, para cada hembra, la semana de apareamiento y la dosis recibida por los machos, así como las frecuencias de implantes vivos y muertos.

El cálculo del efecto total de la letalidad dominante se basa en la comparación del número de implantes vivos por hembra en el grupo tratado y en el de control. Se analiza la relación entre implantes vivos y muertos en el grupo tratado, en comparación con la obtenida en el grupo de control, para deducir las pérdidas tras la implantación.

Si se registran los datos en forma de muertes precoces y tardías, se indicará claramente esta diferencia en las tablas. Si se calculan las pérdidas antes de la implantación, debe informarse de ellas. Tales pérdidas pueden calcularse a modo de diferencias entre el número de cuerpos lúteos y el de implantes, o de reducción del número medio de implantes por hembra en relación con los apareamientos de control.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, edad y pesos de los animales utilizados, número de animales de cada sexo en los grupos tratados y controles

— sustancia estudiada, vehículo, niveles posológicos ensayados y justificación de su elección, controles negativos y positivos, datos relativos a la toxicidad

— vía y programa de tratamiento

— programa de apareamiento

— método utilizado para comprobar el apareamiento

— momento del sacrificio

— criterios de recuento de los efectos de la letalidad dominante

— relación dosis-respuesta, si es posible

— evaluación estadística

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.23. ENSAYO CITOGENETICO DE CELULAS EMBRIONARIAS DE MAMIFERO *IN VIVO*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Esta prueba citogenética *in vivo* permite descubrir aberraciones cromosomicas estructurales en los espermatogonios. Consisten en el análisis de las mitosis de los espermatogonios en busca de aberracciones de tipo cromatidiano y cromosómico.

Se emplean en este método preparaciones de testículos de mamíferos expuestos a la sustancia química estudiada por vías apropiadas y sacrificados a intervalos variables. Antes del huso, como la colquicina, para acumular las células en fase de mitosis de tipo metafásico(c-metafase). Se obtienen preparaciones de cromosomas que se secan al aire, se tiñen y se analizan al microscopio.

El análisis de espermatocitos en diacinesia, metafase I, en busca de multivalentes de translocación después de tratamiento de las células tronco de los espermatogonios, puede aportar información complementaria útil.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles, se disuelven o suspenden en un vehículo apropiado. Se utilizarán soluciones recién preparadas del compuesto analizado. Si se recurre a un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar la sustancia estudiada ni producir efectos tóxicos.

Vía de administración

En general, las sustancias analizadas sólo se administrarán una vez. Basándose en la información toxicológica disponible, podrá emplearse un programa de tratamiento reiterado, únicamente cuando la sustancia no ejerza efecto citotóxico en los espermatogonios en diferenciación.

Las vías de administración usuales son la oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras.

Animales de experimentación

Se utilizan casi siempre ratones y hamsteres chinos, pero cabe recurrir a cualquier otra especie de mamífero.

Se utilizan machos sexualmente maduros que se distribuyen al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

Número de animales

Han de emplearse al menos cinco machos por grupo experimental y de control.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento grupos simultáneos de control positivo y negativo (vehículo).

Las sustancias de control positivo se utilizarán en una dosis baja apropiada (p. ej., mitomicina C, intraperitonealmente, a razón de 0,3 mg/kg) para demostrar la sensibilidad de la prueba.

Dosis

Se emplea una dosis de la sustancia estudiada de la intensidad máxima tolerada o que produzca signos de toxicidad. Si tal dosis provoca la destrucción de numerosas células, deberá utilizarse una dosis más baja que origine citotoxicidad. Cuando sea necesario establecer una relación dosis-respuesta, habrán de usarse al menos tres dosis (p.ej., para confirmar una respuesta positiva débil). Las sustancias atóxicas se estudiarán a la dosis máxima posible, ya sea la administración única o repetida.

Procedimiento

En general, sólo se administra una vez la sustancia estudiada a los animales. En el grupo que recibe la dosis máxima, se recogen muestras con tres intervalos tras el tratamiento. La muestra intermedia se obtiene a las 24 horas. Dado que la sustancia estudiada puede influir en la cinetica del ciclo celular, las muestras primera y tercera se recogen, con intervalos apropiados, en un plazo de 6 a 48 horas tras la administración de la sustancia. Cuando se utilicen otros niveles posológicos, se obtendrán muestras durante la fase especialmente sensible o, cuando no se conozca, 24 horas después del tratamiento.

También cabe la posibilidad de emplear un programa de tratamiento reiterado. En tal caso, se sacrifica a los animales 24 horas después del último tratamiento. Pueden obtenerse otras muestras entre las 6 y las 24 horas posteriores al tratamiento.

Preparación de los testículos

Para el análisis de las mitosis de los espermatogonios, se inyecta a los animales por vía intraperitoneal una dosis apropiada de un inhibidor del huso, como la colchicina. Acto seguido, se sacrifica a los animales tras un periodo adecuado, que en los ratones es de 3 a 5 horas, en tanto que en los hámsteres chinos puede superar las 5 horas.

Se utiliza la técnica de secado al aire, aunque según la especie empleada pueden ser necesarias modificaciones del método estándar. Se obtienen suspensiones celulares, que se tratan con solución hipotónica y se fijan. Las células se extienden sobre portaobjetos y se tiñen. Se asigna un código a los portaobjetos antes de analizarlos al microscopio.

Análisis

Se analizan al menos 100 metafases mitóticas bien extendidas, con el número completo de centrómeros, en busca de aberraciones cromosómicas estructurales. Además, es posible determinar el índice de mitosis de los espermatogonios con relación a la primera y la segunda metafases meióticas en una muestra total de 100 células en división por animal para establecer un posible efecto citotóxico.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que se indiquen por separado todos los tipos de aberraciones para cada animal de control y tratado. Se incluirán el número total de células analizadas y el de células aberrantes por grupo. Se facilitarán las medias y la desviación estándar para todos los parámetros. Se recogerá en forma de tabla el índice medio de mitosis de los espermatogonios en relación con las metafases meióticas primera y segunda para cada grupo experimental y de control.

Los datos se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie y cepa de los machos, edad y peso de los machos

— número de animales de cada grupo experimental y de control

— condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles posológicos, disolventes, inhibidor del huso utilizado

— número de células analizadas por animal en cada grupo

— para cada animal tratado y de control, tipo y número de aberraciones, por separado

— evaluación estadística

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.24. ENSAYO DE LA MANCHA EN EL RATÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definición

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se trata de una prueba que se realiza *in vivo* en ratones, cuyos embriones en desarrollo se exponen a la sustancia estudiada. Las células efectoras de los embriones en desarrollo son los melanoblastos, y los genes efectores son los responsables de la pigmentación del pelo. Los embriones son heterocigotos para cierto número de estos genes. Una mutación en el alelo dominante de tal gen o su pérdida (a consecuencia de fenómenos genéticos diversos) en un melanoblasto provoca la expresión del fenotipo recesivo en sus células descendientes, con la aparición consiguiente de una mancha de otro color en el pelo del ratón resultante. Se cuenta el número de descendientes portadores de manchas (mutaciones), y se compara su frecuencia con la observada en la descendencia procedente del desarrollo de embriones tratados únicamente con el disolvente. La prueba de la mancha en el ratón descubre supuestas mutaciones somáticas en las células fetales.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias se disuelven o suspenden en solución salina isotónica. Las que sean insolubles en agua se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no debe alterar la sustancia estudiada ni provocar efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

Animales de experimentación

Se aparean animales de la cepa T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con la cepa HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearlpe/pe) o con la C57 BL (nonagouti, a/a). Pueden utilizarse otros cruces apropiados, como entre NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) y DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), siempre que produzcan descendencia nonagouti.

Número y sexo

Se tratan hembras grávidas suficientes para obtener un número de descendientes vivos apropiado para cada nivel posológico utilizado. El tamaño de la muestra dependerá del número de manchas observadas en los ratones tratados y de la importancia del número de datos de control. Sólo se considerará aceptable un resultado negativo si se han examinado al menos 300 descendientes de hembras tratadas con la dosis máxima.

Uso de controles negativos y positivos

Ha de disponerse de datos de control simultáneos procedentes de ratones tratados sólo con el vehículo (controles negativos). Pueden agruparse datos de control históricos obtenidos en el mismo laboratorio para mejorar la sensibilidad de la prueba, siempre que tales datos sean homogéneos. Si la sustancia analizada no resulta ser mutágena, debera disponerse de datos de control positivos obtenidos en fecha reciente en el mismo laboratorio con una sustancia de potencial mutágeno conocido en esta prueba.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intrubación oral y la inyección intraperitoneal de las hembras grávidas. Cuando convenga, se recurrirá al tratamiento por inhalación u otras vías de administración.

Dosis

Se utilizan al menos dos niveles posológicos, incluido uno que origine signos de toxicidad o reduzca el tamaño de las camadas. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima practicable.

Procedimiento

Normalmente, se administra un tratamiento único los días 8, 9 ó 10 de la gestación, considerando como día 1 aquél en que se observe por primera vez el tapón vaginal. Estos días corresponden a 7,25, 8,25 y 9,25 días tras la concepción. Pueden efectuarse, pasados estos días, tratamientos sucesivos.

Análisis

Al cabo de tres o cuatro semanas del nacimiento, se asignan códigos a la descendencia y se comprueba si existen manchas. Se distinguen tres clases de manchas:

a) las manchas blancas a menos de 5 mm de la linea mesoventral, que se suponen consecuencia de muerte celular (WMVS),

b) las manchas amarillas, de tipo agouti, asociadas con los pezones, los órganos sexuales, la garganta, las regiones axilar e inguinal y la parte central de la frente, que se suponen debidas a falta de diferenciación (MDS), y

c) las manchas pigmentadas y blancas repartidas al azar por el pelaje, que se creen resultado de mutaciones somáticas (RS).

Se cuentan las tres clases, pero sólo la última, la RS, tiene significación genética. Los problemas que plantea la diferenciación de las clases MDS y RS pueden solucionarse examinando muestras de pelo con el microscopio de fluorescencia.

Se observarán las anomalías morfológicas macroscópicas evidentes de la descendencia.

2. RESULTADOS

Los datos se presentarán en forma del número total de crías examinadas y del número de las que presenten una o varias manchas supuestamente debidas a mutación somática. Se compararán por métodos apropiados los datos de los animales tratados y los controles negativos. Asimismo, se ofrecerán los resultados considerando la camada como unidad.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— cepas utilizadas en el cruce

— número de hembras grávidas en los grupos experimental y de control

— tamaño medio de las camadas en los grupos experimentales y de control en el nacimiento y al destete

— dosis de la sustancia estudiada

— disolvente utilizado

— día de la gestación en que se administró el tratamiento

— vía de administración

— número total de descendientes examinados, y número con WMVS, MDS y RS en los grupos experimental y de control

— anomalías morfológicas macroscópicas

— relación dosis/respuesta de RS, si es posible

— evaluación estadística

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B.25. TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definición**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

La prueba de translocación hereditaria en el ratón descubre alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas en las células embrionarias de mamíferos, tal como se ponen de manifiesto en la descendencia de primera generación. Los tipos de alteraciones cromosómicas apreciados son translocaciones recíprocas y, si se incluye la descendencia femenina, pérdida del cromosoma X. Los portadores de translocaciones y las hembras XO muestran una fertilidad reducida que permite la selección de una descendencia F_1 para practicar un análisis citogenético. Una esterilidad total es consecuencia de tipos de translocación determinados (autosoma X y tipo c-t). Las translocaciones se observan citogenéticamente en las células meióticas en diacinesis-metafase I de los individuos machos, ya sean machos F_1 o hijos de hembras F_1. Las hembras XO se identifican citogenéticamente por la presencia de sólo 39 cromosomas en las mitosis de la médula ósea.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles en agua, se disuelven o suspenden en vehículos apropiados. Se emplean soluciones recién preparadas de la sustancia estudiada. Si se utiliza un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar el compuesto analizado ni provocar efectos tóxicos.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras vías.

Animales de experimentación

Para facilitar la reproducción y la verificación citológica, estos experimentos se realizan con ratones; no es preciso que sean de una cepa determinada. Sin embargo, el tamaño medio de una camada de la cepa empleada deberá ser superior a 8, y relativamente constante. Se utilizarán animales sanos y sexualmente maduros.

Número de animales

El número de animales necesario depende de la frecuencia de translocaciones espontáneas, así como del índice mínimo de inducción preciso para obtener un resultado positivo.

La prueba suele realizarse mediante análisis de la descendencia masculina F_1. Al menos 500 descendientes machos F_1 se analizan por grupo de dosis. Si se incluye la descendencia femenina F_1 son necesarios 300 machos y 300 hembras.

Uso de controles negativos y positivos

Debe disponerse de datos sobre controles adecuados procedentes de pruebas realizadas simultáneamente y de controles históricos. Si existen resultados aceptables de controles positivos procedentes de experimentos efectuados en fecha reciente en el mismo laboratorio, pueden utilizarse en lugar de un control positivo simultáneo.

Dosis

Se prueba una dosis, por lo general la máxima asociada con la producción de efectos tóxicos mínimos pero que no altere el comportamiento reproductor ni la supervivencia. Para establecer una relación dosis/respuesta, son necesarias otras dos dosis. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima posible.

Procedimiento

Tratamiento y apareamiento

Existen dos programas de tratamiento. De ellos, el más utilizado es la administración única de la sustancia estudiada. La sustancia también puede administrarse los 7 días de la semana durante 35 días. El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de administración, y garantizara la obtención de muestras de todos los estadios de las células embrionarias tratadas. Al final del periodo de apareamiento, se coloca a las hembras en jaulas individuales. Cuando dan a luz, se registra la fecha, el tamaño de la camada y el sexo de los descendientes. Se desteta a toda la descendencia masculina y se descarta toda la femenina, salvo si se incluyen en el experimento.

Búsqueda de los heterocigotos de translocación

Se utiliza uno de los dos métodos posibles:

— estudio de la fertilidad de la descendencia F_1, y verificación posterior de posibles portadores de translocaciones por análisis citogenéticos;

— análisis citogenético de toda la progenie F_1 masculina sin selección previa mediante estudio de fertilidad.

a) Estudio de la fertilidad

Es posible determinar la fertilidad reducida de un individuo F_1 observando el tamaño de la camada, analizando el contenido uterino de su compañera femenina o por ambos medios. Es necesario fijar los criterios de determinación de la fertilidad normal y reducida de la cepa de ratón utilizada.

Observación del tamaño de la camada: Los machos F_1 sometidos a estudio se colocan en jaulas individuales con hembras procedentes del mismo experimento o de la colonia. Las jaulas se inspeccionan a diario a partir de los 18 días tras el apareamiento. Se registran, en el momento del nacimiento, el tamaño de la camada y el sexo de la descendencia F_2, y se descartan luego las crías. Si se estudia la descendencia femenina F_1, se conserva la descendencia F_2 procedente de camadas pequeñas para un análisis en mayor profundidad. Las hembras portadoras de una translocación se someten a verificación por análisis citogenetico de una translocación en cualquiera de sus descendientes machos. Las hembras XO se identifican por la modificación de sexos en su descendencia, que pasa de 1:1 a 1:2 machos/hembras. En un método secuencial, los machos F_1 normales no se someten a nueva verificación si la primera camada F_2 alcanza o supera un valor normal predeterminado; de lo contrario, se observan una segunda y una tercera camadas F_2.

Los animales F_1 que no puedan clasificarse como normales tras observación de hasta un máximo de tres camadas F_2 se someten a un nuevo control mediante análisis del contenido uterinfo de sus compañeras femeninas, o sufren directamente análisis citogenético.

Análisis del contenido uterino: La reducción del tamaño de las camadas en los portadores de translocaciones se debe a la muerte de embriones, por lo que un número alto de implantes muertos indica la presencia de una translocación en el animal sometido a la prueba. Cada macho F_1 estudiado se aparea con 2 ó 3 hembras. Se comprueba si existe concepción mediante el examen matinal diario para descubrir la presencia de tapones vaginales. Las hembras se sacrifican 14 ó 16 días después, y se registra el número de implantes vivos y muertos presentes en su útero.

b) Análisis citogenético

Se obtienen preparaciones de testículos por el método de secado con aire. Los portadores de translocaciones se identifican por la presencia de configuraciones multivalentes en diacinesis metafase I en los espermatocitos primarios. La observación de al menos 2 células con una asociación multivalente constituye la prueba necesaria de que el animal estudiado es portador de una translocación.

Si no se ha realizado selección mediante análisis de la fecundidad, se practica estudio citogenético en todos los machos F_1. Deben analizarse al microscopio un mínimo de 25 células en diacinesis/metafase I por macho. En los machos F_1 con testículos pequeños y que presenten una detención meiótica antes de la diacinesis, o en las hembras F_1 que se sospeche sean XO, es necesario el examen de las metafases mitóticas en los espermatogonios o en la médula ósea. La presencia de un cromosoma desusadamente largo o corto en 10 células, demuestra la existencia de una translocación especial que origina la esterilidad del macho (tipo c-t). Algunas translocaciones X autosomas que provocan la esterilidad del macho sólo pueden identificarse mediante un análisis de las bandas de cromosomas mitóticos. La presencia de 39 cromosomas en la totalidad de 10 mitosis es demostrativa de un estado XO en una hembra.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

Se registran, en el nacimiento y el destete para cada periodo de apareamiento, el tamaño medio de las camadas y la relación entre sexos.

En lo que respecta a la evaluación de la fertilidad de los animales F_1, se expondrán el tamaño medio de las camadas procedentes de todos los apareamientos normales, así como el tamaño de cada una de las surgidas de animales F_1 portadores de translocación. En cuanto al análisis del contenido uterino, se harán constar el número medio de implantes vivos y muertos producto de apareamientos normales, y el de implantes vivos y muertos de cada apareamiento de portadores de translocación.

Respecto al análisis citogenético de la diacinesis-metafase I, se enumerarán el número de tipos diferentes de configuraciones multivalentes y el número total de células en cada portador de translocación.

Se comunicarán el número total de apareamientos y la duración del período de apareamiento de los individuos estériles F_1. Se facilitarán asimismo el peso de los testículos y detalles del análisis citogenético.

Para hembras XO, se dan resultados del tamaño medio de la camada, de la razón de sexos de la progenie F_2 y del análisis citogenético.

Cuando se preseleccionan, por pruebas de fertilidad, posibles F_1 portadores de translocación, las tablas deben incluir información relativa a cuántos de éstos eran heterocigotos de translocación confirmados.

Se dan también datos de los experimentos de control negativo y control positivo.

3. INFORME

3.1. Datos de la prueba

El informe incluirá los datos siguientes:

— cepa de ratones, edad de los animales, pesos de los animales tratados

— número de animales reproductores de cada sexo en los grupos experimentales y de control

— condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles de las dosis, disolventes, frecuencia de apareamientos

— número y sexo de los descendientes por cada hembra, número y sexo de los descendientes criados para análisis de translocación

— tiempos y criterios de análisis de translocación

— número y descripción detallada de los portadores de translocación, incluyendo datos de reproducción y de contenido uterino, cuando proceda

— procedimientos citogenéticos y detalles del análisis microscópico, preferiblemente con fotografías

— evaluación estadística

— discusión de resultados

— interpretación de resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.26. TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Se administran a diario, por vía oral, dosis crecientes de la sustancia estudiada a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo durante un periodo de 90 días. Durante el periodo de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. **Criterio cualitativo**

Ninguno.

1.6. **Descripcion del método**

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada puede administrarse en la dieta, por alimentación forzada, en cápsulas o en el agua de bebida. Todos los animales deben recibirla por el mismo método durante todo el periodo de experimentación. Si se emplean un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, no deben tener efectos tóxicos. En caso necesario, pueden utilizarse datos publicados.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Salvo indicación en contrario, la especie preferible es la rata. Han de utilizarse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio habituales, y la administración se iniciará de preferencia antes de que las ratas tengan 6 semanas de vida, y en todo caso no después de haber cumplido las 8. Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al ± 20 % del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica se utilizarán en ambos las mismas especies y cepas.

Número y sexo

Cada dosis ha de administrarse al menos a 20 animales (10 hembras y 10 machos). Las hembras deben ser nulíparas y no estar preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días y observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, los controles deben recibir el vehículo del mismo modo que los grupos tratados, y en igual cantidad que la suministrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados.

En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la incidencia de mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Cuando se administre la sustancia estudiada en la alimentación, pueden emplearse una concentración alimenticia constante (ppm o mg/kg de alimento) o una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe especificarse la opción escogida. Si se administra la sustancia por alimentación forzada, la dosis ha de darse a la misma hora todos los días. Las dosis se ajustarán a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantengan a un nivel constante en relación con el peso del animal.

Prueba de límite

Si una prueba de 90 días de duración, realizada de acuerdo con el método descrito con una dosis de 1 000 mg/kg de peso/día, o con una dosis superior en función de una posible exposición humana (siempre que se conozca ésta), no provoca indicio alguno de un efecto tóxico, puede no considerarse necesaria la realización de pruebas ulteriores. Cuando se trate de sustancias de toxicidad escasa, es importante asegurarse de que, cuando se administran en la alimentación, las cantidades y otras propiedades de la sustancia objeto de estudio no alteran las necesidades nutritivas normales.

Período de observación

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

El régimen ideal comprende la administración de la sustancia ensayada a los animales los 7 días de la semana durante un periodo de 90 días. Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben conservarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia.

Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento (y de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) y el peso de los animales.

Es necesaria la observación periódica de los animales para evitar en lo posible la pérdida de animales de la prueba por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes del grupo de tratamiento no satélite. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican comúnmente los exámenes siguientes:

a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, hay que examinar a todos los animales.

b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento leucocitario total y diferencial y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.

c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de

la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopiruvica [1] y glutamicooxaloacética [2] séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspetidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.

d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, hay que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado, para un posible examen histopatológico posterior, los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, tráquea y pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglios linfáticos representativos, (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervios periféricos, esternón con médula ósea, (ojos), (fémur, incluida la superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácio y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

a) Se someterán a un examen histopatológico completo los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima.

b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.

c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.

d) Se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico, en busca de signos de infección ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. También debe considerarse la posibilidad de practicar exámenes histopatológicos del hígado y los riñones de estos grupos. Es posible que en estos animales no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.

e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba

— dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis

— dosis carente de efectos, si es posible

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste

— datos sobre alimentación y peso

— hallazgos oftalmológicos

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

---

[1] Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
[2] Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

B.27. TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA

ENSAYO DE 90 DÍAS EN NO ROEDORES

1. **MÉTODO**

1.2. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Se administran a diario, por vía oral, dosis crecientes de la sustancia estudiada a varios grupos de animales de experimentación (no roedores), a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueran durante la prueba se someterán a autopsia, que se practicará también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. **Criterio cualitativo**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada puede administrarse en la alimentación, o quizá se considere más conveniente darla en cápsulas. Cabe utilizar otros métodos de administración oral. Todos los animales deben recibirla por el mismo método durante todo el período de experimentación. Si se emplea un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, deberá conocerse que carecen de efectos tóxicos. En caso necesario, pueden utilizarse datos publicados.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

La especie de uso común es el perro, preferiblemente de raza definida, pero pueden emplearse otras. Se utilizarán animales jóvenes y sanos y, en el caso del perro, la administración se iniciará preferiblemente a los 4-6 meses de edad, y no después de los 9 meses. Cuando se realice una prueba oral subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie/raza.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 8 animales (4 hembras y 4 machos) para cada dosis. El número de animales al final del estudio será suficiente para permitir una evaluación significativa de los efectos tóxicos.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Los animales del grupo de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. La dosis máxima originará efectos tóxicos, pero no fallecimientos. La dosis más baja no provocará signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis intermedia produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados.

En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, no deben producirse fallecimientos.

Cuando se trate de sustancias de toxicidad escasa, es importante cerciorarse de que las cantidades que de ellas se administren con la alimentación no obstaculizarán la nutrición normal.

Cuando se administre la sustancia estudiada con la alimentación, puede emplearse una concentración alimenticia constante (ppm o mg/kg de alimento) o una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe especificarse la opción escogida. Si se administra la dosis directamente, por ejemplo en cápsulas, ha de darse a las mismas horas todos los días, y se ajustará según sea necesario a intervalos semanales para mantener un nivel constante en relación con el peso del animal. Si se emplea una prueba subcrónica con carácter preliminar a una crónica, debe emplearse, por lo general, un régimen alimenticio similar en ambos estudios.

Prueba de límite

Si una prueba de 90 días de duración, realizada según el método descrito con una dosis de 1 000 mg/kg de peso/día, o con una dosis superior en función de una posible exposición humana (cuando se conozca ésta), no provoca indicio alguno de efecto tóxico, puede no considerarse necesaria la realización de pruebas ulteriores. Cuando se trate de sustancias de toxicidad escasa, es importante asegurarse de que, cuando se administran en la alimentación, las cantidades y otras propiedades de la sustancia objeto de estudio no alteran las necesidades nutritivas normales.

Período de observación

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

El régimen ideal comprende la administración a los animales de la sustancia ensayada, los 7 días de la semana durante un período de 90 días. No obstante, y en razón fundamentalmente de consideraciones prácticas, cuando se administre la sustancia por un medio distinto de la alimentación, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Entre las observaciones deben figurar (aunque no de modo exclusivo) las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento (y de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) y el peso de los animales.

Se procederá a diario a un examen clínico detenido de los animales, y se adoptarán medidas apropiadas para reducir al mínimo la pérdida de los animales estudiados. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los animales supervivientes. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia. En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

b) Pruebas hematológicas, realizadas al principio a intervalos mensuales o a la mitad del período de estudio y, por último, al final de éste: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento leucocitario total y diferencial, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.

c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre, al principio, a intervalos mensuales o a la mitad del período de estudio y, por último, al final de éste. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepática y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a la especie/raza), transaminasas glutamicopirúvica [1] y glutamicooxaloacética [2] sérica, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias

[1] Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
[2] Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea necesario, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados. Los no roedores se someterán a un período de ayuno (no superior a 24 horas) antes de obtener muestras de sangre.

d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo cuando esté indicado por efectos tóxicos probables o manifiestos.

Autopsia

Debe practicarse en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales, tiroides (con paratiroides) y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación.

Se conservarán en un medio adecuado para su posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, glándulas salivales, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), vesícula biliar, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), esternón con médula ósea, (fémur, incluida superficie articular) y (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

Se someterán a un examen histopatológico completo los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima. En los demás grupos tratados, se practicarán exámenes histopatológicos de los órganos que presenten lesiones en el grupo con la dosis máxima, o cuando las observaciones clínicas así lo aconsejen.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que muestran lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— raza o cepa de la especie, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba

— dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis

— dosis carente de efectos, si es posible

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo (con atención especial a los hallazgos clínicos)

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste

— datos sobre alimentación y peso

— hallazgos oftalmológicos

— pruebas hematológicas prácticas y sus resultados completos

— pruebas de bioquímica clínica empleada y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados cuando proceda

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.28. TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se aplican a diario dosis crecientes de la sustancia estudiada en la piel de animales de experimentación integrados en varios grupos, a razón de una dosis por grupo durante un periodo de 90 días. Durante el periodo de aplicación se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Antes de proceder a la aplicación, se elimina el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Puede emplearse afeitado, pero deberá practicarse aproximadamente 24 horas antes de la prueba. Suelen ser necesarios cortes o afeitados reiterados del pelo, más o menos a intervalos semanales. Al practicarlos, hay que cuidar de no lesionar la piel. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia en estudio, una superficie no inferior al 10 % de la corporal. Para decidir la zona que debe despejarse y las dimensiones de la superficie a tratar, se tendrá en cuenta el peso del animal. Cuando se prueben sólidos, que pueden pulverizarse si se considera oportuno, se humedecerá lo suficiente la sustancia estudiada con agua o, en caso necesario, un vehículo apropiado para garantizar un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se emplean por lo general sin diluir. Se practican aplicaciones diarias 5 o 7 días a la semana.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Pueden emplearse ratas, conejos o cobayas adultos. Es posible emplear otras especies, pero su uso exigiría justificación. Al principio de la prueba, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al ± 20 % del peso medio.

Cuando se realice una prueba dérmica subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie y cepa.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) con piel sana para cada dosis. Las hembras serán nulíparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos y un control, o un control para el vehículo si se emplea éste. El periodo de exposición no será inferior a 6 horas diarias. La aplicación de la sustancia de prueba debe hacerse a las mismas horas todos los días, y la cantidad del producto se ajustará a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantenga una dosis constante en relación con el peso del animal. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, el grupo de control lo recibirá de igual modo que los grupos tratados, y en cantidad igual a la administrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a ese valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Si la aplicación de la sustancia probada provoca una irritación cutánea grave, se reducirán las concentraciones, lo que quizá origine una reducción, o la ausencia, de otros efectos tóxicos con la dosis alta. Si la piel ha sufrido lesiones importantes, quizá sea necesario dar por concluido el estudio y emprender uno nuevo a concentraciones menores.

Prueba de límite

Si una experiencia previa realizada con una dosis de 1 000 mg/kg, o superior, en función de la posibilidad de exposición humana (siempre que ésta se conozca) no ha provocado efecto tóxico alguno, cabe considerar inútil la continuación de la experiencia.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

Los animales se alojarán en jaulas individuales. El régimen ideal comprende la administración, a los animales, de la sustancia ensayada los 7 días de la semana durante un periodo de 90 días.

Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben observarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. El periodo de exposición diario será de 6 horas.

La sustancia estudiada se aplicará uniformemente sobre una zona que corresponda aproximadamente al 10 % de la superficie corporal total. En caso de sustancias muy tóxicas, la zona tratada puede ser inferior, pero se cubrirá con una capa lo más uniforme y delgada posible.

Durante la exposición, la sustancia estudiada se mantiene en contacto con la piel con ayuda de un apósito de gasa poroso y esparadrapo no irritante. Además, la zona tratada se cubrirá de forma que se mantengan colocados el apósito y la sustancia y se impida a los animales la ingestión de ésta. Cabe utilizar dispositivos de sujeción para evitar la ingestión de la sustancia objeto de estudio, pero no se recomienda la inmovilización completa.

Al final del período de exposición, se eliminará la sustancia restante, siempre que sea posible, por medio de agua o algún otro método apropiado de limpieza de la piel.

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales. Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del periodo de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes de los grupos de tratamiento no satélites. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.

c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica (1) y glutamicooxaloacética (2) séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.

d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido timico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales accesorios, vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), (esternón con médula ósea), (fémur, incluida superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

a) Se someterán a un examen histopatológico completo la piel normal y la tratada, y los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y los de dosis máxima.

b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.

c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.

d) Si se utilizan ratas, se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico en busca de signos de infección, ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.

e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

(1) Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
(2) Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación
— condiciones de la prueba
— dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones
— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis
— dosis carente de efectos, si es posible
— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia
— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo
— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste
— datos sobre alimentación y peso
— hallazgos oftalmológicos
— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos
— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)
— hallazgos de autopsia
— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos
— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible
— comentario de los resultados
— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.29. TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN

ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Se expone a diario, durante un período de tiempo determinado, a varios grupos de animales de experimentación, a concentraciones diferentes de la sustancia objeto de estudio, una concentración por grupo, durante un plazo de 90 días. En los casos en que se emplea un vehículo como ayuda para lograr una concentración apropiada de la sustancia ensayada en la atmósfera, se utilizará un grupo de control del vehículo. Durante el período de administración, se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueran durante la prueba se someterán a autopsia, que se practicará también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. En caso necesario, se añadirá a la sustancia estudiada un vehículo adecuado que ayude a lograr una concentración apropiada de la sustancia en la atmósfera. Si se utilizaran un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, deberán saberse exentos de efectos tóxicos. Si se juzga oportuno, pueden emplearse datos publicados.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Salvo indicación en contrario, la especie preferible es la rata. Se utilizarán animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual. Al principio del estudio, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al ± 20 % del valor medio apropiado. Cuando se realice un estudio de inhalación subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos la misma especie y cepa.

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (diez hembras y diez machos) para cada concentración de exposición. Las hembras serán nuliparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (diez de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Concentración de exposición

Son necesarias al menos tres concentraciones, y un control o control del vehículo (correspondiente a la concentracion del vehículo en el nivel de exposición máximo). Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a este valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos toxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Período de exposición

La exposición diaria será de 6 horas tras la obtención de las concentraciones en la cámara de exposición. Cabe utilizar otros períodos para satisfacer necesidades especiales.

Equipo

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Cuando se utilice una cámara, deberá ser de características tales que permita un hacinamiento mínimo de los animales y su exposición óptima a la sustancia objeto de ensayo. Como norma general para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada. También cabe recurrir a sistemas con exposición oronasal, de la cabeza sola o de todo el cuerpo en cámara individual; los dos primeros reducen la penetración por otras vías.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y de los de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

Procedimiento

Se expone a los animales diariamente a la sustancia estudiada, a razón de 5 ó 7 días a la semana, durante un período de 90 días. Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. La temperatura a la que se efectúa la prueba debe mantenerse, con variaciones de ± 3° en 22° C. La humedad relativa ideal sería la comprendida entre el 30 y el 70 %, pero en determinados casos (p. ej., pruebas con aerosoles) quizá no sea factible. Durante la exposición, se suprimirán el alimento y la bebida.

Se utilizará un sistema de inhalación dinámico que disponga de un sistema apropiado de control analítico de la concentración. Se recomienda practicar un primer ensayo para determinar las concentraciones de exposición adecuadas. Se ajustará el flujo de aire de forma que se garanticen unas condiciones de exposición homogeneas en toda la cámara. El sistema permitirá obtener condiciones de exposición estables con la mayor rapidez posible.

Se determinarán o controlarán:

a) El flujo de aire (continuamente).

b) La concentración real de la sustancia estudiada, medida en la zona de respiración. Durante el período de exposición diaria, la concentración no diferirá en más del ± 15 % del valor medio. No obstante, cuando se trate de polvos y aerosoles, quizá no sea posible esta precisión, y podrá aceptarse una desviación mayor. Se mantendrán durante la totalidad del estudio lo más constante posible las concentraciones diarias. Al ajustar el sistema generador, se practicará un análisis granulométrico de las partículas, para determinar la estabilidad de las concentraciones de aerosol. Durante la exposición, se practicarán con la frecuencia necesaria análisis para determinar la estabilidad de la distribución granulométrica.

c) Temperatura y humedad.

d) Durante la exposición y después de ella, se practican y registran sistemáticamente observaciones; se llevarán fichas individuales de cada animal. Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones deben figurar las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos, las membranas mucosas, los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Se determinarán cada semana el consumo de alimento y el peso de los animales. Es necesaria una observación periódica de los animales para

evitar la pérdida de alguno de ellos por causas como canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del periodo de prueba, se realiza la autopsia a todos los animales supervivientes. Los animales moribundos deben retirarse y someterse a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.

c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepática y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica (1) y glutamicooxaloacética (2) séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglibina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.

d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino sólo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, los pulmones — que se extirparán intactos, se pesarán y se tratarán con un fijador adecuado para garantizar el mantenimiento de su estructura (se considera método eficaz la perfusión con el fijador) —, los tejidos nasofaríngeos, el cerebro — incluidos cortes de bulbo/protuberancia —, corteza cerebelosa y encefálica, pulmones, corazón, aorta, glándulas salivales, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, (órganos genitales accesorios), (piel), vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), esternón con médula ósea, (fémur, incluida superficie articular), y (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar). Los tejidos que aparecen entre paréntesis sólo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

a) Se someterán a un examen histopatológico completo el aparato respiratorio y otros órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y con la dosis máxima.

b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.

c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.

d) Se someterán también a examen histopatológico los pulmones de los animales pertenecientes a los grupos con dosis baja e intermedia, por constituir un medio conveniente de valoración del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.

e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

(1) Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
(2) Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición: Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación

b) temperatura y humedad del aire

c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)

d) naturaleza del vehículo, si se emplea

e) concentraciones reales en la zona de respiración

f) dimensiones medias de las partículas (si procede)

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la concentración

— dosis carente de efectos, si es posible

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste

— datos sobre alimentación y peso

— hallazgos oftalmológicos

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.30. ESTUDIO DE TERATOGENICIDAD: ROEDORES Y NO ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis o concentraciones diferentes, al menos durante la parte de la gestación en que tiene lugar la organogénesis, a varios grupos de animales de experimentación grávidos, a razón de una dosis por grupo. Poco antes de la fecha de parto prevista, se sacrifica a la madre, se extrae el útero y se examina su contenido. Este método de prueba investiga la embriotoxicidad y la toxicidad fetal.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Hembras jóvenes adultas y sanas vírgenes, de edad y tamaño semejantes, se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante al menos 5 días antes de la prueba. Posteriormente son apareadas con machos de fertilidad comprobada, tras lo cual se distribuirán al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

La sustancia estudiada se administra a diario a las hembras desde poco después de la implantación y durante el período de la organogénesis. Un día antes del término, se extraen por histerectomía los fetos y se examinan en busca de anomalías viscerales o esqueléticas, incluidos retraso del crecimiento, osificación tardía y hemorragias intestinales.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Las especies de uso habitual son la rata, el ratón, el hámster y el conejo. Las preferidas son la rata y el conejo. Se utilizarán cepas de laboratorio de uso habitual. La cepa no debe ser de fecundidad escasa, y se caracterizará por su respuesta a los agentes teratógenos. Se alojará a los animales en jaulas individuales.

Número y sexo

Son necesarias para cada dosis al menos 20 ratas, ratones o hámsteres grávidas o 12 conejas grávidas. El objetivo es conseguirun número de camadas y crías suficiente para permitir una evaluación del potencial teratógeno de la sustancia.

Dosis

Deben emplearse al menos tres niveles posológicos y un control. Cuando se administre la sustancia estudiada en un vehículo, se utilizará también un grupo de control de éste. Si se emplea vehículo, han de conocerse sus propiedades toxicológicas; no deberá ser teratógeno ni ejercer efectos sobre la reproducción. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo o grupos de control recibirán un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. A menos que lo impidan la naturaleza física/química o las propiedades biológicas de la sustancia, lo ideal sería que la dosis más alta provocara cierta toxicidad materna manifiesta, en forma, por ejemplo, de una leve pérdida de peso, pero no más de un 10 % de muertes maternas. La dosis más baja no generará efectos observables atribuibles a la sustancia objeto de estudio. La o las dosis intermedias se situarán geométricamente entre las mayores y las más bajas.

Prueba de límite

Cuando se trate de sustancias de escasa toxicidad, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce indicios de embriotoxicidad o teratogénesis, pueden considerarse innecesarios los estudios con otras dosis.

Período de exposición

Se considerará día 0 de la prueba aquel en que se observe la presencia de tapón vaginal, esperma o ambos (cuando sea posible). El período de administración abarcará la etapa principal de la organogénesis, que serían los días 6-15 en la rata y el ratón, 6-14 en el hámster y 6-18 en el conejo. Si se toma por día 0 el de la observación del apareamiento, o el de la inseminación artificial, habrá que añadir 1 día a los plazos indicados. Otra posibilidad es la de ampliar el período de administración hasta aproximadamente 1 día antes de la fecha de parto prevista.

Período de observación

Es preciso proceder una exploración física detenida al menos una vez al día. Se efectuarán diariamente observaciones complementarias, y se adoptarán medidas para reducir al mínimo la pérdida de animales del estudio.

Procedimiento

La sustancia objeto de estudio se administra oralmente por alimentación forzada. Deberá darse aproximadamente a la misma hora todos los días.

Los animales hembras reciben diariamente la sustancia ensayada durante el período de tratamiento apropiado. La dosis puede basarse en el peso de las hembras al principio de la administración de la sustancia; dado el rápido aumento de peso que experimentan durante la gestación, también cabe la posibilidad de pesar a los animales periódicamente para adaptar la dosis al último peso obtenido. Se registrarán, según se observen, los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Las hembras que muestren signos de aborto o parto prematuro se sacrificarán y someterán a un examen macroscópico completo. La observación postratamiento continuará hasta aproximadamente 1 día antes del término; el objetivo es cubrir la mayor parte del período de gestación, pero evitar complicar la interpretación de los resultados como consecuencia de partos naturales. Entre las observaciones realizadas deben figurar (aunque no de modo exclusivo) las de modificaciones de la piel y el pelo, ojos y membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales.

Autopsia

En el momento de la muerte durante el estudio, o al final de él, se examinará macroscópicamente a la hembra en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas que puedan haber influido en la gestación. Inmediatamente después del fallecimiento, se extirpará el útero, cuyo contenido se examinará para investigar las muertes embrionarias o fetales y el número de fetos vivos. Suele ser posible calcular el momento de la muerte *in utero* cuando se ha producido. En ratas y conejos es posible determinar el número de cuerpos lúteos. Se determinarán el sexo y el peso de cada feto; con los datos recogidos, se calculará el peso fetal medio. Tras la extracción, se someterá a cada feto a examen externo. En ratas, ratones y hámsteres, se prepararán y examinarán en busca de anomalías esqueléticas del 30 al 50 % de los animales de cada camada, en tanto que el resto de los integrantes de las camadas se prepararán y examinarán mediante métodos apropiados en busca de anomalías de los tejidos blandos. En el caso de los conejos, se examinará cada feto mediante disección cuidadosa en busca de anomalías viscerales y, a continuación, se comprobará si existen anomalías esqueléticas.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del estudio, el de los grávidos, el número y porcentajes de los fetos vivos y los fetos con anomalías esqueléticas y de los tejidos blandos y su relación con camadas específicas.

Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. **Datos del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba

— dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones

— datos de respuesta tóxica en función de la dosis

— dosis carente de efectos (si es posible)

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste

— datos sobre alimentación y peso

— duración de la gestación y datos de la camada (incluidos datos publicados)

— datos fetales (vivos/muertos, sexo, defectos esqueléticos y de tejidos blandos)

— datos de la camada (vivos/muertos, sexo, defectos esqueléticos y de tejidos blandos de cada camada)

— tratamiento estadístico de los resultados

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B.31. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (de roedores o no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos, de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al ± 20 % del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 40 animales (20 hembras y 20 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nuliparas y no gravidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

En no roedores, puede aceptarse un número menor de animales, aunque no inferior a cuatro por sexo y grupo.

Dosis y frecuencia de exposición

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos definidos de toxicidad sin causar una mortalidad excesiva. La dosis más baja no debe provocar indicio alguno de toxicidad.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Normalmente, la exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará también un grupo de control negativo concurrente. Este grupo de control negativo se tratará de igual manera que los grupos de prueba, salvo en que los animales no se expondrán a la sustancia estudiada ni a ningún vehículo.

Vía de administración

Las dos vías de administración principales son la oral y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

El uso de la vía dérmica plantea problemas prácticos considerables. Normalmente, es posible deducir la toxicidad crónica general debida a la absorción percutánea de los resultados de la prueba hecha por vía oral y de la cantidad de sustancia absorbida por vía percutánea en pruebas de toxicidad percutanea previas.

Estudios orales:

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, y si la ingestión es una v posible de exposición humana, se preferirá la vía oral de administración, salvo si existen contraindicaciones. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas. Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis a la semana es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el periodo exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios de inhalación:

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales 5 días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los 7 días de la semana (exposición permanente) con una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio. Una diferencia importante entre la exposición intermitente y la permanente es que con la primera existe un periodo de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un periodo de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de control, más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de, al menos, 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

(i) Flujo del aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.

(ii) Concentración: durante el periodo diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del ± 15 % del valor medio.

(iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a 22° C (± 2° C), y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70 %, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.

(iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de éste no sea respirable.

Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad, cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

La duración del periodo de administración será de, al menos, doce meses.

Procedimiento

Observaciones

Se realizará, al menos una vez al día, una exploración clínica detenida. Se practicarán diariamente observaciones complementarias, y se adoptarán medidas apropiadas para reducir al mínimo las pérdidas de animales del estudio, en forma, por ejemplo, de auptosia o refrigeración de los animales encontrados muertos, y de aislamiento o sacrificio de los débiles o moribundos. Son necesarias observaciones detenidas para apreciar el comienzo y la evolución de efectos tóxicos, así como para reducir las pérdidas de animales por enfermedad, autólisis o canibalismo.

Se anotarán para todos los animales los signos clínicos, incluidas tanto las alteraciones neurológicas y oculares como la mortalidad. Se registrarán el momento de comienzo y la evolución de los procesos tóxicos, incluidos los presuntos tumores.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del periodo de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad. Se determinará la ingestión de alimento cada semana durante las 13 primeras del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo que el estado de salud o las modificaciones del peso aconsejen otra actitud.

Examen hematológico

Se realizará un examen hematológico (p. ej., contenido de hemoglobina, hematocrito, recuentos de hematíes y leucocitos, plaquetas u otras medidas de la capacidad de coagulación) a los tres y a los seis meses, y después con intervalos aproximados de seis y, al final, sobre muestras de sangre recogidas de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos. A ser posible, las muestras procederán de las mismas ratas en cada intervalo. Además, a los no roedores se les extraerá una muestra antes de la prueba.

Si las observaciones clínicas indican un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se practicará un recuento con fórmula leucocitaria de los animales afectados.

Se averiguará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales del grupo con dosis máxima y de los controles. Sólo se determinará en los grupos con dosis menores si se aprecia una discrepancia importante entre el grupo con dosis máxima y los controles, o si lo aconsejan los hallazgos patológicos.

Análisis de orina

Se recogerán para su análisis muestras de orina de todos los animales no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas que sirvan para el examen hematológico y respetando intervalos idénticos. Se realizarán las determinaciones siguientes en animales individuales, o en una muestra acumulada/sexo/grupo en el caso de los roedores:

— aspecto: volumen y densidad en cada animal

— proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta (semicuantitativamente)

— microscopía del sedimento (semicuantitativamente).

Química clínica

Con intervalos aproximados de 6 meses y a la conclusión, se extraen muestras de sangre para determinaciones de química clínica de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas en cada intervalo. Además, se recogerá en todos los no roedores una muestra previa a la prueba. Se prepara plasma a partir de estas muestras, y se realizan las determinaciones siguientes:

— concentración de proteínas totales

— concentración de albúmina

— pruebas de función hepática (como actividad de fosfatasa alcalina, transaminasa glutamicopirúvica (1) y transaminasa glutamicooxaloacética (2), gammaglutamiltranspeptidasa, ornitindescarboxilasa

— metabolismo de carbohidratos, como glucemia en ayunas

— pruebas de función renal, como nitrógeno ureico en sangre.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Antes del sacrificio, se recogerán de todos los animales muestras de sangre para la realización de recuentos sanguíneos con fórmula leucocitaria. Se conservarán todas las lesiones macroscópicas visibles, así como los tumores o lesiones que se sospeche son tumores. Se intentarán relacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

Se conservarán para examen histopatológico todos los órganos y tejidos, habitualmente los siguientes: cerebro (3) (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, (incluidas paratiroides), timo, pulmones (incluida tráquea), corazón, aorta, glándulas salivales, hígado (3), bazo, riñones (3), suprarrenales (3), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos, páncreas, gónadas (3), órganos genitales accesorios, glándula mamaria femenina, piel, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea y fémur (incluida articulación) y ojos. El inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el medio óptimo de conservación de estos tejidos; por otro lado, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se examinará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Si se realizan otros exámenes clínicos, la información con ellos obtenida deberá estar disponible antes del examen microscópico, ya que puede suponer una orientación importante para el anatomopatólogo.

Examen histopatológico

Se examinarán al microscopio todas las alteraciones visibles, y en particular los tumores y demás lesiones aparecidas en cualquier órgano. Se recomiendan además los procedimientos siguientes:

a) Examen microscópico de todos los órganos y tejidos conservados, con descripción completa de todas las lesiones encontradas en:

   1. los animales muertos o sacrificados durante el estudio, y

   2. los animales del grupo con dosis máxima y controles.

b) Se examinarán también los órganos o tejidos de animales con dosis mínima que muestren anomalías causadas de forma indudable o posible por la sustancia objeto de estudio.

c) Cuando el resultado de la prueba indique una reducción sustancial del periodo vital de los animales o la inducción de efectos capaces de influir en la respuesta tóxica, se someterá al examen citado en el párrafo anterior a los animales tratados con la dosis inmediatamente inferior.

d) Es indispensable disponer de información sobre la incidencia de las lesiones que afectan normalmente a la cepa de animales en condiciones iguales a las de la prueba (es decir, datos de control publicados) para evaluar correctamente el significado de las modificaciones observadas en los animales tratados.

(1) Conocida actualmente como alanimaminotransferasa.
(2) Conocida actualmente como asparatoaminotransferasa.
(3) Estos órganos, de diez animales por sexo y grupo en los roedores y de todos los no roedores, se pesarán, lo mismo que la tiroides (con las paratiroides) de todos los roedores.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba:

  Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

  Datos de exposición: Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

  a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación

  b) temperatura y humedad del aire

  c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)

  d) naturaleza del vehículo, si se emplea

  e) concentraciones reales en la zona de respiración

  f) dimensiones medias de las partículas (si procede)

— dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis

— dosis carente de efectos

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste

— datos sobre alimentación y peso

— hallazgos oftalmológicos

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.32. ENSAYO DE CARCINOGÉNESIS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra normalmente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad, y en particular la aparición de tumores.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos cinco días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (de roedores y no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al ± 20% del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 100 animales (50 hembras y 50 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

Dosis y frecuencia de exposición

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos de toxicidad mínimos, como una leve disminución de la ganancia de peso corporal (inferior al 10%), sin alterar de manera notable la duración normal de la existencia a causa de efectos distintos de tumores.

La dosis más baja no debe alterar el crecimiento, el desarrollo ni la longevidad normales del animal, ni generar indicio alguno de toxicidad. En general, no será inferior al 10% de la dosis alta.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Normalmente, la exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará otro grupo de control que no se expondrá al vehículo.

Vía de administración

Las tres vías de administración principales son la oral, la dérmica y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

Estudios orales

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, y si la ingestión es una vía posible de exposición humana, se preferirá la vía oral de administración, salvo si existen contraindicaciones. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas.

Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis semanales es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios dérmicos

Es posible optar por la exposición cutánea mediante aplicación sobre la piel con un pincel para simular una vía importante de exposición del ser humano, así como modo de sistema modelo para la inducción de lesiones cutáneas.

Estudios de inhalación

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales cinco días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los siete días de la semana (exposición permanente) a una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de las sustancia objeto de estudio.

Una diferencia es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de técnicas de control más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición:

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la

sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar le estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5% del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

(i) Flujo de aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.

(ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del ± 15% del valor medio. Durante todo el estudio, las concentraciones se mantendrán lo más constantes posible de un día a otro.

(iii) Temperatura y humedad: en roedores, la temperatura se mantendrá a 22° C (± 2° C), y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70%, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.

(iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de él no sea respirable. Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

Una prueba de carcinogénesis debe abarcar la mayor parte del período de existencia de los animales a ella sometidos: 18 meses en ratones y hámsteres y 24 meses en ratas; sin embargo, en determinadas cepas de animales de mayor longevidad o índice de tumoración espontánea bajo, se prolongará hasta 24 meses en ratones y hámsteres y hasta 30 en ratas. También es posible dar por concluido un estudio ampliado cuando el número de supervivientes en el grupo con dosis más baja o de control alcance el 25%. Cuando en una prueba se observen respuestas aparentemente diferentes en cada sexo, se les estudiará por separado. Si sólo fallecieran prematuramente los animales del grupo con dosis alta, por causas evidentes de toxicidad, no es obligada la conclusión del estudio, siempre y cuando las manifestaciones tóxicas no provoquen problemas en los demás grupos. Para considerar aceptable una prueba negativa, es preciso que no se pierda más del 10% de los animales de cualquier grupo por causa de autólisis, canibalismo o problemas de organización, y que la supervivencia en todos los grupos no sea inferior al 50%, en ratones y hámsteres a los 18 meses y a los 24 en ratas.

Procedimiento

Observaciones

Las observaciones diarias de los animales en sus jaulas deben incluir los cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento.

Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno de ellos por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

Se registrarán los signos clínicos y la mortalidad para todos los animales. Ha de prestarse una atención especial a la tumorogénesis; se registrarán el momento de aparición y la localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

Se determinará el consumo de alimento (y el de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) semanalmente durante las 13 primeras semanas del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo si aconsejaran otra cosa el estado de salud o las alteraciones del peso corporal.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad.

Exámenes clínicos

Hematología

Si las observaciones indicaran un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se determinará la fórmula leucocitaria de los animales afectados.

A los 12 y 18 meses y antes del sacrificio, se obtiene de los animales un frotis sanguíneo. Se determinará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales de los grupos con dosis máxima y de control. Si estos datos, especialmente los obtenidos antes del sacrificio, o los obtenidos del examen histopatológico así lo aconsejan, se determinarán también las fórmulas leucocitarias en el grupo o grupos inmediatamente inferiores.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Se conservarán todos los tumores o lesiones macroscópicas visibles, así como las lesiones que se sospeche son tumores.

Se conservarán en medios adecuados para un posible examen histopatológico los órganos y tejidos siguientes: cerebro (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, pulmones y tráquea, corazón, aorta, glándulas salivares, hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales secundarios, piel, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio infático representativo, glándula mamaria femenina, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea, fémur (incluida articulación) y ojos.

El inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el medio óptimo de conservación de estos tejidos; por otro lado, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se estudiará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Examen histopatológico

a) Se realizará un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos de todos los animales fallecidos o sacrificados durante la prueba, y de los miembros de los grupos de control y con la dosis máxima.

b) Se examinarán al microscopio en todos los grupos todos los tumores macroscópicos visibles o las lesiones que se sospeche son tumores.

c) Si existe una diferencia significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas entre el grupo con dosis máxima y el de control, se practicará un examen histopatológico sobre el órgano o tejido de que se trate en los demás grupos.

d) Si la supervivencia del grupo con dosis máxima es notablemente inferior a la observada en el de control, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

e) Si se apreciaran en el grupo con dosis máxima indicios de la inducción de efectos tóxicos o de otro tipo capaces de influir en una respuesta neoplásica se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que han mostrado tumores apreciables durante el mismo, el momento del descubrimiento y el número de animales en que se encontraron tumores después del sacrificio. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición:

Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la varibilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación

b) temperatura y humedad del aire

c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)

d) naturaleza del vehículo, si se emplea

e) concentraciones reales en la zona de respiración

f) dimensiones medias de las partículas (si procede)

— dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones

— datos de la incidencia de tumores en función del sexo, la dosis y el tipo tumoral

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de éste

— datos sobre alimentación y peso

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados, con descripción de los métodos empleados

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véasa Introducción general, Parte B.

B.33. ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

El objetivo de una prueba combinada de toxicidad crónica y carcinogénesis es determinar los efectos crónicos y cancerígenos de una sustancia en una especie de mamífero tras exposición prolongada.

A este fin, se completa una prueba de carcinogénesis con un grupo satélite tratado y otro de control, por lo menos. La dosis empleada para el grupo satélite con dosis máxima puede ser superior a la utilizada para idéntico grupo en la prueba de carcinogénesis. Los animales de la prueba de carcinogénesis se examinan tanto en busca de signos de toxicidad general como de una respuesta cancerígena. Los animales del grupo satélite tratado se examinan en busca de signos de toxicidad general.

La sustancia objeto de estudio se administra normalemente siete días a la semana, por una vía apropiada, a varios grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo, durante una parte importante de su existencia. Durante la exposición a la sustancia estudiada, y después de ella, se observa a diario a los animales para apreciar posibles signos de toxicidad.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control.

Animales de experimentación

La especie preferida es la rata, aunque pueden utilizarse otras (roedores o no roedores) basándose en los resultados de estudios previos. Deben emplearse animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso habitual, y la administración se iniciará lo antes posible tras el destete.

Al principio del estudio, el peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior al ± 20 % del valor medio. Cuando se practique un estudio oral subcrónico previo a otro de índole crónica, se utilizarán en ambos las mismas especie/raza y cepa.

Número y sexo

En roedores, se utilizarán al menos 100 animales (50 hembras y 50 machos) para cada dosis y grupo de control correspondiente. Las hembras serán nulíparas y no grávidas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio.

El grupo o grupos satélites tratados para la evaluación de alteraciones patológicas distintas de los tumores contendrán 20 animales de cada sexo, en tanto que el grupo de control satélite constará de 10 animales de cada sexo.

Dosis y frecuencia de exposición

Para el estudio de la carcinogénesis se utilizarán al menos tres niveles posológicos, además del grupo de control correspondiente. La dosis más alta debe originar signos de toxicidad mínima, como una disminución en la ganancia de peso corporal (inferior al 10 %), sin alterar en medida notable la duración normal de la existencia por causa de efectos distintos de tumores.

La dosis más baja no debe alterar el crecimiento, el desarrollo ni la longevidad normales del animal, ni generar indicio alguno de toxicidad. En general, no será inferior al 10 % de la dosis máxima.

La o las dosis intermedias se situarán más o menos en un punto medio entre la alta y la baja.

En la selección de las dosis se tendrán en cuenta datos de pruebas y estudios de toxicidad precedentes.

Para estudiar la toxicidad crónica, se incluirán en la prueba grupos tratados adicionales y un grupo satélite de control correspondiente. La dosis máxima de los animales satélites tratados producirá signos definidos de toxicidad.

Normalmente, la frecuencia de exposición será diaria. Si se administra la sustancia química en el agua de bebida o mezclada con el alimento, deberá estar continuamente disponible.

Controles

Se utilizará un grupo de control idéntico en todos los aspectos a los tratados, salvo por la no exposición a la sustancia probada.

En circunstancias especiales, como las concurrentes en estudios de inhalación con aerosoles o en caso de empleo de un emulgente de actividad biológica no caracterizada en estudios orales, se utilizará también un grupo de control negativo concurrente. Este grupo de control negativo se tratará de igual manera que los grupos de prueba, salvo en que los animales no se expondrán a la sustancia estudiada ni a ningún vehículo.

Vía de administración

Las tres vías de administración principales son la oral, la dérmica y la respiratoria (inhalación). La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía probable de exposición en seres humanos.

Estudios orales

Cuando la sustancia estudiada se absorba en el aparato gastrointestinal, se preferirá la vía oral de administración. Los animales pueden recibir la sustancia con la alimentación, disuelta en el agua de bebida o por medio de cápsulas.

Lo ideal sería la administración los siete días de la semana, ya que con 5 dosis a la semana es posible una recuperación o la reducción de la toxicidad en el período exento de dosis, con la consiguiente influencia en el resultado y la evaluación posterior. Sin embargo, y por motivos esencialmente prácticos, se considera aceptable la administración 5 días a la semana.

Estudios dérmicos

Es posible optar por la exposición cutánea mediante aplicación sobre la piel con un pincel para simular una vía importante de exposición del ser humano, así como a modo de sistema modelo para la inducción de lesiones cutáneas.

Estudios de inhalación

Dado que los estudios de inhalación plantean problemas técnicos de mayor complejidad que las demás vías de administración, ofrecemos aquí una orientación más detallada sobre este modo de administración. Hay que señalar también que la instilación intratraqueal constituye un método válido en situaciones determinadas.

Las exposiciones prolongadas suelen adecuarse a las condiciones de exposición humana proyectadas; así, se expone a los animales 5 días a la semana (exposición intermitente) durante 6 horas diarias tras equilibrado de las concentraciones en la cámara de prueba, o bien los 7 días de la semana (exposición permanente) a una exposición diaria de 22 a 24 horas, dedicando alrededor de una hora a la alimentación de los animales (horario regular) y el mantenimiento de la cámara. En ambos casos, los animales suelen exponerse a concentraciones fijas de la sustancia objeto de estudio. Una diferencia importante entre la exposición intermitente y la permanente es que con la primera existe un período de 17 a 18 horas en que los animales pueden recuperarse de los efectos de cada exposición diaria, con un período de recuperación aún mayor durante los fines de semana.

La elección de la exposición intermitente o permanente dependerá de los objetivos del estudio y de la exposición humana que pretenda simularse. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas dificultades técnicas. Por ejemplo, es posible que las ventajas de la exposición permanente en la simulación de condiciones ambientales queden contrapesadas por la necesidad de suministrar alimento y bebida durante la exposición, así como por la necesidad de técnicas de generación de aerosoles y vapores, y de técnicas de control, más complicadas (y fiables).

Cámaras de exposición

Los animales se someterán al estudio en un dispositivo de inhalación capaz de mantener un flujo de aire continuo de al menos 12 renovaciones de aire a la hora, y de garantizar un contenido de oxígeno apropiado y una distribución uniforme del producto estudiado en el aire. Las cámaras de control y de exposición serán de construcción y diseño idénticos para garantizar condiciones de exposición comparables en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia probada. Por regla general, se mantiene una ligera presión negativa en el interior de la cámara para impedir el escape de la sustancia estudiada a la zona circundante. Se evitará el hacinamiento de los animales en las cámaras. Como norma general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total de los animales de experimentación no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara empleada.

Se practicarán determinaciones o controles de:

(i) Flujo del aire: el flujo de aire en la cámara se controlará preferiblemente de modo constante.

(ii) Concentración: durante el período diario de exposición, la concentración de la sustancia estudiada no diferirá en más del ± 15 % del valor medio.

(iii) Temperatura y humeded: en roedores, la temperatura se mantendrá a 22° C (± 2° C), y la humedad en el interior de la cámara del orden del 30 al 70%, salvo cuando se emplee agua para suspender la sustancia estudiada en la atmósfera de la cámara. Ambos factores se controlarán preferiblemente de modo continuo.

(iv) Análisis granulométrico de las partículas: en las atmósferas de la cámara que exijan la utilización de aerosoles líquidos o sólidos, se determinará la distribución de las partículas por tamaños. Las partículas de los aerosoles serán de un tamaño respirable para el animal de experimentación utilizado. Se recogerán muestras de las atmósferas de la cámara en la zona de respiración de los animales. La muestra de aire estará acorde con la distribución de las partículas a las que se exponga a los animales y será representativa, sobre una base gravimétrica, de la totalidad del aerosol en suspensión, incluso aunque gran parte de éste no sea respirable. Los análisis granulométricos se efectuarán con frecuencia durante la adaptación del sistema generador para garantizar la estabilidad del aerosol, y con posterioridad cuando se consideren necesarios para determinar debidamente la constancia de la distribución de las partículas a que se expone a los animales.

Duración del estudio

La parte de la prueba dedicada a la carcinogénesis debe abarcar la mayor parte del período de existencia de los animales a ella sometidos: 18 meses en ratones y hámsteres, y 24 meses en ratas; sin embargo, en determinadas cepas de animales de mayor longevidad o de índice de tumoración espontánea bajo, se prolongará hasta los 24 meses en ratones y hámsteres, y los 30 en ratas. También es posible dar por concluido un estudio ampliado cuando el número de supervivientes en el grupo con dosis más baja o de control alcance el 25 %. Cuando en una prueba se observen respuestas aparentemente diferentes en cada sexo, se les estudiará por separado. Si sólo fallecieran prematuramente los animales del grupo con dosis alta por causas evidentes de toxicidad, no es obligada la conclusión del estudio, siempre y cuando las manifestaciones tóxicas no provoquen problemas en los demás grupos. Para considerar aceptable una prueba negativa, es preciso que no se pierda más del 10 % de los animales de cualquier grupo por causa de autólisis, canibalismo o problemas de organización, y que la supervivencia en todos los grupos no sea inferior al 50 % a los 18 meses en ratones y hámsteres, y a los 24 en ratas.

Los grupos satélites de 20 animales tratados por sexo y 10 animales de control asociados por sexo, utilizados para estudiar la toxicidad crónica, se mantendrán en la prueba durante al menos 12 meses. Se programará el sacrificio de estos animales para determinar la posible existencia de patología relacionada con la sustancia estudiada y no complicada por alteraciones gerontológicas.

Procedimiento

Observaciones

Los animales deben observarse diariamente en sus jaulas, comprobando los cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas así como en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, la actividad somatomotriz y el comportamiento.

Se efectuarán exploraciones clínicas a intervalos apropiados en los animales de los grupos satélites tratados.

Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

Se anotarán para todos los animales los signos clínicos, incluidas tanto las alteraciones neurológicas y oculares como la mortalidad. Ha de prestarse una atención especial a la tumorogénesis; se registrarán el momento de aparición y la localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópico o palpable; se registrarán asimismo el momento de comienzo y la evolución de los procesos tóxicos.

Se determinará el consumo de alimento (y el de agua cuando se administre en ella la sustancia estudiada) semanalmente durante las 13 primeras semanas del estudio, y luego a intervalos aproximadamente trimestrales, salvo si aconsejaran otra actitud el estado de salud o las alteraciones del peso corporal.

Se determinará y anotará el peso de cada animal una vez a la semana durante las 13 primeras del período de prueba, y al menos una vez cada 4 semanas con posterioridad.

Exámenes clínicos

Hematología

Se realizará un examen hematológico (p. ej., contenido de hemoglobina, hematocrito, recuentos de hematíes y leucocitos, plaquetas u otras medidas de la capacidad de coagulación) a los tres y los seis meses, después con intervalos aproximados de seis meses y, al final, sobre muestras de sangre recogidas de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos. A ser posible, las muestras procederán de las mismas ratas en cada intervalo.

Si las observaciones clínicas indican un menoscabo de la salud de los animales durante el estudio, se practicará un recuento con fórmula leucocitaria de los animales afectados.

Se averiguará la fórmula leucocitaria en muestras de los animales del grupo con dosis máxima y de los controles. Sólo se determinará en los grupos con dosis menores si se aprecia una discrepancia importante entre el grupo con dosis máxima y los controles, o si lo aconsejan los hallazgos patológicos.

Análisis de orina

Se recogerán para su análisis muestras de orina de todos los animales no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas que sirvan para el examen hematológico y respetando intervalos idénticos. Se realizarán las determinaciones siguientes en animales individuales, o en una muestra acumulada sexo/grupo en el caso de los roedores:

— aspecto: volumen y densidad en cada animal

— proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta (semicuantitativamente)

— microscopía del sedimento (semicuantitativamente).

Bioquímica

Con intervalos aproximados de 6 meses y a la conclusión, se extraen muestras de sangre para determinaciones de bioquímica de todos los no roedores y de 10 ratas/sexo de todos los grupos, a ser posible de las mismas ratas en cada intervalo. Además, se recogerá en todos los no roedores una muestra previa a la prueba. Se prepara plasma a partir de estas muestras, y se realizan las determinaciones siguientes:

— concentración de proteínas totales

— concentración de albúmina

— pruebas de función hepática (como actividad de fosfatasa alcalina, transaminasa glutamicopirúvica [1] y transaminasa glutamicooxaloacética [2], gammaglutamiltranspeptidasa, ornitindescarboxilasa

— metabismo de carbohidratos, como glucemia en ayunas

— pruebas de función renal, como nitrógeno ureico en sangre.

(1) Conocida actualmente como alaninaaminotransferasa.
(2) Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa.

Autopsia

Se practicará una autopsia completa en todos los animales, incluidos los fallecidos durante el experimento o sacrificados al encontrarse moribundos. Antes del sacrificio, se recogerán de todos los animales muestras de sangre para la realización de recuentos sanguíneos con fórmula leucocitaria. Se conservarán todas las lesiones macroscópicas visibles, así como los tumores o lesiones que se sospeche son tumores. Se intentarán relacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

Se conservarán para examen histopatológico todos los órganos y tejidos, habitualmente los siguientes: cerebro [1] (bulbo/protuberancia, corteza cerebelosa y encefálica), hipófisis, tiroides, (incluida paratiroides), timo, pulmones (incluida tráquea), corazón, aorta, glándulas salivares, hígado [1], bazo, riñones [1], suprarrenales [1], esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos, páncreas, gónadas [1], órganos genitales accesorios, glándula mamaria femenina, piel, musculatura del muslo, nervio periférico, médula espinal (cervical, dorsal, lumbar), esternón con médula ósea y fémur (incluida articulación) y otros.

Aunque el inflado de pulmones y vejiga urinaria con un fijador es el método óptimo de conservación de estos tejidos, el inflado de los pulmones es esencial en los estudios de inhalación para efectuar un examen histopatológico apropiado. En estudios especiales, como los de inhalación, se examinará la totalidad del aparato respiratorio, incluidas nariz, faringe y laringe.

Si se realizan otros exámenes clínicos, la información con ellos obtenida deberá estar disponible antes del examen microscópico, ya que puede suponer una orientación importante para el anatomopatólogo.

Examen histopatológico

En el apartado de toxicidad crónica:

Se practicará un examen detallado de los órganos conservados de todos los animales de los grupos satélites con dosis máxima y de control. Si se encontrara patología relacionada con la sustancia estudiada en el grupo satélite con dosis máxima, se someterán a un examen histopatológico completo y detallado los órganos efectores de los demás animales de cualquier otro grupo satélite tratado, así como los de los grupos tratados del apartado de carcinogénesis del estudio, a la conclusión de éste.

En el apartado de carcinogénesis:

a) Se realizará un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos de todos los animales fallecidos o sacrificados durante la prueba, y de los miembros de los grupos de control y con la dosis máxima.

b) Se examinarán al microscopio, en todos los grupos, todos los tumores macroscópicos visibles o las lesiones, que se sospeche son tumores, aparecidas en cualquier órgano.

c) Si existe una diferencia significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas entre el grupo con dosis máxima y el de control, se practicará un examen histopatológico sobre el órgano, o tejido de que se trate, en los demás grupos.

d) Si la supervivencia del grupo con dosis máxima es notablemente inferior a la observada en el de control, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

e) Si se apreciaran en el grupo con dosis máxima indicios de la inducción de efectos tóxicos, o de otro tipo, capaces de influir en una respuesta neoplásica, se examinará detenidamente el grupo con dosis inmediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que han mostrado tumores apreciables durante el mismo, el momento del descubrimiento y el número de animales en que se encontraron tumores después del sacrificio.

Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

(1) Se pesaran estos órganos, de diez animales por sexo y grupo de roedores.

— condiciones de la prueba:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos diseño, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema de generación de partículas y aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire evacuado y, cuando se emplee, método de alojamiento de los animales en la cámara de prueba. Se describirá el equipo empleado para determinar la temperatura, la humedad y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosol o el tamaño de las partículas.

Datos de exposición:

Se presentarán en forma de tabla en la que figuren tanto los valores medios como una medida de la variabilidad (p. ej., desviación estándar), y comprenderán:

a) flujos de aire a través del dispositivo de inhalación

b) temperatura y humedad del aire

c) concentraciones nominales (cantidad total de la sustancia estudiada introducida en el dispositivo de inhalación, dividida por el volumen de aire)

d) naturaleza del vehículo, si se emplea

e) concentraciones reales en la zona de respiración

f) dimensiones medias de las partículas (si procede)

— dosis (incluido el vehículo, si se emplea) y concentraciones

— datos de la incidencia de tumores en función del sexo, la dosis y el tipo tumoral

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia

— datos de la respuesta tóxica, por sexo y dosis

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo

— momento de observación de cada signo anómalo y evalución de éste

— hallazgos oftalmológicos

— datos sobre alimentación y peso

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede)

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B.34. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

1. MÉTODO

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P) recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos, para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en el estro. A continuación, se aparea a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante el período experimental apropiado. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, éstos no deberán ser tóxicos. Se administrará la substancia los 7 días de la semana.

Animales de experimentación

Las especies preferidas son la rata y el ratón. Han de utilizarse animales sanos, no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él.

El objetivo es conseguir gestaciones y progenie suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno de los animales de la generación P así como en la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F_1 desde la concepción al destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden suministrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química, o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 ó 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia de toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo de alteración del rendimiento reproductor, serán necesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, serán necesarios estudios con otras dosis.

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 a 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considerara conveniente la producción de una segunda camada; se les sacrificará y examinará en algún momento antes de finalizar el estudio. En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de cinco días de aclimatación, por lo menos, y continuará durante al menos dos semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F_1. Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido tres semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquél en que se encuentre un tapón vaginal o esperma.

Las parejas que no se aparean se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente. Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar a su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cuatro machos y cuatro hembras por camada. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (p. ej., cinco machos y tres hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de ocho crías.

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y de apareamiento, puede determinarse a diario el consumo de alimento. Tras el parto y durante la lactancia, se determinará el consumo de alimento (o de agua cuando la sustancia en estudio se administre en el agua de bebida) en los mismos días en que se pesen las camadas. Los machos y hembras P se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales. Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

Patología

Autopsia

Cuando los animales de la generación P se sacrifiquen, o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectores de todos los animales P. En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales con dosis máxima y en los controles y en los animales que mueran durante el estudio, siempre que sea posible.

Se examinarán entonces, en todos los demás animales P, los órganos que muestren anomalías en aquéllos. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado al exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

2. RESULTADOS

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de machos fértiles, el de hembras grávidas, los tipos de alteraciones y el procentaje de animales que mostraban cada alteración.

Cuando sea posible, los resultados numéricos se enumerarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie y cepa utilizada

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta el día previsto para el sacrificio al final del estudio

— tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento postnatal

— día de observación de cada signo anómalo y su evolución

— datos de peso de los animales P

— hallazgos de autopsia

— descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Véase Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase Introducción general, Parte B.

B.35. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

1. **MÉTODO**

1.1. **Introducción**

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. **Definiciones**

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. **Sustancias de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos de la generación paterna (P) deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P), recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos; para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso sobre el estro. A continuación, se aparea a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. Tras el desrete, continúa la administración de la sustancia a la descendencia F_1 durante su crecimiento hasta la edad adulta, su apareamiento y producción de una generación F_2, hasta el destete de esta generación F_2. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuyen al azar los animales sanos para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales P se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante la totalidad del período experimental. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, éstos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

Animales de experimentación: selección de la especie

Las especies preferidas son la rata y el ratón. Han de utilizarse animales P sanos no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él. El objetivo es conseguir gestaciones y progenie suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno, y

de la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F_1 desde la concepción a la madurez, así como del desarrollo de su descendencia (F_2) hasta el destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden administrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno, y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 ó 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia de toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo alguno de alteración del rendimiento reproductor, son innecesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, son innecesarios estudios con otras dosis.

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 ó 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considera conveniente la producción de una segunda camada; se sacrificarán y examinarán en algún momento antes de finalizar el estudio.

En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de cinco días de aclimatación por lo menos, y continuará durante al menos dos semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F_1.

Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

El tratamiento de los animales F_1 se iniciará con el destete, y terminará cuando se sacrifiquen.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido tres semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquél en que se encuentre un tapón vaginal o esperma. Habida cuenta de la espermatogénesis, la generación F_1 no se apareará hasta que tenga por lo menos 11 semanas si son ratones, o 13 si son ratas. Para el apareamiento de la generación F_1, se seleccionan al azar un macho y una hembra de cada camada para apareamiento cruzado con una cría de otra camada del mismo grupo de tratamiento, con objeto de producir la generación F_2. Los machos y hembras F_1 no seleccionados para apareamiento se sacrificarán al destete.

Las parejas que no se aparean se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente. Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere emplear la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cuatro machos y cuatro hembras por camada. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (p. ej., cinco machos y tres hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de ocho crías. Las camadas F_2 se ajustan de la misma manera.

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y apareamiento, puede determinarse semanalmente el consumo de alimento. Opcionalmente, cabe medirlo a diario. Tras el parto y durante la lactancia se determinará el consumo de alimento en los mismos días en que se pesen las camadas. Los animales progenitores (P y F_1) se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales. Se registrarán las nomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

Patología

Autopsia

Todos los animales adultos P y F_1 se sacrificarán cuando ya no sean necesarios para evaluar los efectos en la reproducción. La descendencia F_1, no seleccionada para apareamiento, y toda la generación F_2 se sacricicarán tras el destete.

Cuando todos los animales progenitores (P y F_1) se sacrifiquen o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epididimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectores de todos los animales P y F_1. En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales P y F_1 con dosis máxima y en los controles seleccionados para apareamiento y, siempre que sea posible, en los que mueran durante el estudio. Se examinarán entonces en todos los demás animales los órganos que muestren anomalías en aquellos animales. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado el exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

2. RESULTADOS

Tratamiento de los resultados

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de animales grávidos, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración.

Cuando sea posible, se evaluarán los resultados numéricos por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie y cepa utilizada

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta su conclusión

— tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento posnatal

— día de observación de cada signo anómalo y su evolución

— datos de peso de los animales F_0 y F_1 seleccionados para apareamiento

— hallazgos de la autopsia

— descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

B.36. TOXICOCINÉTICA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Véase Introducción general, Parte B.

1.2. Definiciones

Véase Introducción general, Parte B.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia objeto de estudio se administra por una vía apropiada. Según el objetivo del estudio, puede administrarse en dosis única o repetida, durante períodos determinados, a uno o varios grupos de animales de experimentación. Con posterioridad, y en función del tipo de estudio, se determinan la sustancia, o sus metabolitos, o ambos en los líquidos, los tejidos o las excreciones corporales.

Pueden realizarse estudios con formas «marcadas» o «no marcadas» de la sustancia probada. Cuando se utilice el marcado, su posición en la sustancia debe suministrar la mayor información posible sobre el destino del compuesto.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

Preparativos

Se aclimatan animales jóvenes y sanos a las condiciones del laboratorio durante, al menos, cinco días previos a la prueba. Antes de ella, se distribuye al azar a los animales para formar grupos de tratamiento. En casos especiales pueden emplearse animales muy jóvenes, grávidos o tratados previamente.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Los estudios toxicocinéticos pueden efectuarse en una o varias especies animales apropiadas; se tendrán en cuenta las especies utilizadas o que esté previsto utilizar en otros estudios toxicológicos con la misma sustancia. Cuando se empleen roedores en una prueba, la variación ponderal no será superior al ± 20 % del peso medio.

Número y sexo

Para estudios de absorción y excreción, cada grupo contendrá inicialmente 4 animales. No es necesaria la elección de un sexo determinado, pero en ciertas circunstancias puede ser preciso estudiar ambos sexos. Si se apreciaran respuestas diferentes según el sexo, se estudiarán cuatro animales de cada uno. Cuando los estudios se hagan con no roedores, pueden utilizarse menos animales.

Si se estudia la distribución en los tejidos, al considerar el tamaño del grupo inicial se tendrán en cuenta el número de animales que se sacrificarán en cada fecha de examen establecida y el número de exámenes.

Cuando se estudie el metabolismo, el tamaño del grupo estará acorde con las necesidades del estudio.

En los estudios con varias dosis y exámenes intermedios, al considerar el tamaño del grupo se tendrá en cuenta el número de exámenes y de sacrificios previstos; no obstante, estará formado por al menos dos animales. El tamaño del grupo será suficiente para permitir una evaluación aceptable del aumento, la estabilización y la reducción (según convenga) de las concentraciones de la sustancia estudiada, de sus metabolitos o de ambos.

Dosis

Cuando se administre una sola dosis, se utilizarán al menos dos niveles posológicos: una dosis baja con la que no se observen efectos tóxicos, y otra alta capaz de producir modificaciones de los parámetros toxicocinéticos o efectos tóxicos.

Si se administran dosis reiteradas, suele bastar la dosis baja, aunque en circunstancias determinadas quizá sea necesaria también una dosis alta.

Vía de administración

Los estudios toxicocinéticos se efectuarán por medio de la misma vía y, cuando convenga, del mismo vehículo empleado o que esté previsto emplear en los demás estudios de toxicidad. La sustancia analizada suele administrarse oralmente por alimentación forzada o en el alimento, aplicarse a la piel o administrarse por inhalación durante periodos definidos a grupos de animales de experimentación. La administración intravenosa de la sustancia puede ser útil para determinar la absorción relativa por otras vías. Además, es posible obtener información útil sobre el patrón de distribución poco después de la administración intravenosa de una sustancia.

Se tendrá presente la posibilidad de una interferencia del vehículo con la sustancia estudiada. Se prestará atención a las diferencias de absorción entre la administración de las sustancias analizadas por alimentación forzada y en el alimento y la necesidad de una determinación exacta de la dosis, sobre todo cuando se administre el compuesto en el alimento.

Período de observación

Se observará a diario a todos los animales, se registrarán los signos de toxicidad y otros rasgos clínicos relevantes, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración de los mismos.

Procedimiento

Después de pesar a los animales, se administra la sustancia objeto de estudio por una vía apropiada. Si se considera oportuno, puede mantenerse a los animales en ayunas antes de la administración de la sustancia.

Absorción

El índice y el grado de absorción de la sustancia administrada pueden valorarse por métodos diversos, con grupos de referencia [1] o sin ellos, por ejemplo mediante:

— determinación de la cantidad de la sustancia estudiada, de sus metabolitos o de ambos en las excretas, como orina, bilis, heces, aire espirado y el contenido en el caparazón

— comparación de la respuesta biológica (p. ej., estudios de toxicidad aguda) entre los grupos de experimentación y de control o referencia (o ambos)

— comparación de la cantidad de sustancia, metabolitos o ambos, excretada por vía renal en los grupos de prueba y de referencia

— determinación de la zona bajo la curva, concentración plasmática/tiempo de la sustancia analizada, sus metabolitos o ambos, y comparación con datos de un grupo de referencia

[1] En este método, se entiende por grupo de referencia aquél al que se administra la sustancia analizada por otra vía que garantiza una disponibilidad completa de la dosis.

Distribución

Existen actualmente dos métodos, de los que uno o ambos pueden utilizarse para analizar los patrones de distribución:

— se obtiene información cualitativa útil, mediante técnicas autorradiográficas del cuerpo entero

— se obtiene información cuantitativa, por sacrificio de los animales en momentos diferentes tras la exposición para determinar la concentración y la cantidad de la sustancia estudiada, sus metabolitos o ambos en tejidos y órganos.

Excreción

En los estudios de excreción, se recogen orina, heces y aire espirado, y en determinadas circunstancias bilis. La cantidad de la sustancia estudiada, sus metabolitos o ambos en estas excretas se determinarán, en varios momentos tras la exposición, hasta que se haya excretado alrededor del 95 % de la dosis administrada o durante siete días, si tal porcentaje no se alcanza antes.

En casos especiales, tal vez deba tenerse en cuenta la excreción de la sustancia en la leche de animales lactantes de experimentación.

Metabolismo

Para determinar el modo y la intensidad del metabolismo, se analizarán muestras biológicas por técnicas apropiadas. Se estudiarán las estructuras de los metabolitos y se propondrán vías metabólicas apropiadas cuando haya necesidad de responder a interrogantes planteados por estudios toxicológicos previos. Quizá sea útil realizar estudios *in vitro* para obtener información sobre las vías metabólicas.

Es posible obtener información complementaria sobre la relación del metabolismo con la toxicidad mediante estudios bioquímicos, como la determinación de los efectos sobre sistemas enzimáticos metabolizantes, la depleción de compuestos endógenos con grupos sulfhidrilos no proteicos y la unión de la sustancia a macromoléculas.

2. RESULTADOS

Según el tipo de estudio realizado, se resumirán los resultados en forma de tablas, complementadas por gráficos cuando proceda. Se mostrarán para cada grupo, cuando convenga, las variaciones medias y estadísticas de las determinaciones en relación con el tiempo, la posología, los tejidos y los órganos. Se establecerán, por métodos apropiados, el grado de absorción y la cantidad e índices de excreción. Cuando se realicen estudios de metabolismo, se indicará la estructura de los metabolitos identificados, y se presentarán las vías metabólicas posibles.

3. INFORME

3.1. Datos del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación

— caracterización de los materiales marcados, cuando se utilicen

— niveles posológicos e intervalos utilizados

— vía o vías de administración y vehículos utilizados

— efectos tóxicos y de otro tipo observados

— métodos de determinación de la sustancia objeto de ensayo, sus metabolitos o ambos en muestras biológicas, incluido el aire espirado

— presentación en tablas de las determinaciones en función de sexo, dosis, régimen, tiempo, tejidos y órganos

— indicación del grado de absorción y excreción con el tiempo

— métodos de caracterización e identificación de los metabolitos en muestras biológicas

— métodos de las determinaciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo

— vías de metabolismo propuestas

— comentario de los resultados

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Véase Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase Introducción general, Parte B.

PARTE C: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE C

Los métodos de ensayo descritos a continuación se destinan a la determinación de algunas de las propiedades ecotoxicológicas mencionadas en el Anexo VIII de la Directiva 79/831/CEE. Los notificantes deberán tener en cuenta que en el texto no se han incluido métodos para la determinación de las siguientes propiedades establecidas en el nivel 1 del Anexo VIII:

— estudio de toxicidad prolongada con *Daphnia magna*

— prueba sobre una planta superior

— estudio de toxicidad prolongada con un pez

— pruebas de acumulación en una especie.

Cuando se aprueben definitivamente métodos de ensayo adecuados para la determinación de estas propiedades, se publicarán en forma de otra adaptación al progreso técnico. Mientras tanto, los notificantes deberán utilizar métodos reconocidos internacionalmente que serán señalados por las autoridades competentes.

PARTE C: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD

C.1. TOXICIDAD AGUDA EN PECES

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este ensayo es determinar la toxicidad letal aguda de una sustancia en peces de agua dulce. Es conveniente disponer, en la medida de lo posible, de una amplia información sobre la hidrosolubilidad, la presión de vapor, la estabilidad química, las constantes de disociación y la biodegradabilidad de la sustancia de ensayo, con el fin de seleccionar el método de ensayo más apropiado (estático, semiestático, dinámico), que permita garantizar concentraciones constantes de la sustancia de ensayo durante todo el período de ensayo.

Tanto en la planificación del ensayo como en la interpretación de los resultados deberá tenerse en cuenta otro tipo de información suplementaria (por ejemplo, la fórmula estructural, el grado de pureza, la naturaleza y porcentaje de impurezas significativas, la presencia y cantidad de aditivos, así como el coeficiente de reparto n-octanol/agua)

1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

La toxicidad aguda es el efecto adverso, discernible, inducido en un organismo como consecuencia de la exposición a una sustancia dada durante un corto período de tiempo (días).

En el presente ensayo, la toxicidad aguda viene expresada como la concentración letal media (CL_{50}), es decir, la concentración que, en el agua, causa la muerte del 50 % de los peces de un lote sometido a ensayo durante un período de exposición continuo que debe indicarse.

Todas las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (mg/l). Pueden expresarse también en peso por peso (mg/kg^{-1}).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Se podrá efectuar un ensayo con una sustancia de referencia a fin de demostrar que, en las condiciones experimentales de laboratorio, la respuesta de la especie sometida al ensayo no ha variado significativamente.

Para este ensayo no se especifica ninguna sustancia de referencia.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Puede realizarse una prueba límite a 100 mg/l, para demostrar que la CL_{50} es mayor que esta concentración.

Se exponen los peces a la sustancia o sustancias de ensayo añadidas al agua, durante un período de 96 horas y en un intervalo de concentraciones determinado. Se registra la mortalidad, como mínimo, cada 24 horas y se calculan, si es posible, las concentraciones causantes de la muerte del 50 % de los peces (CL_{50}) en cada período de observación.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad se aplicarán tanto al ensayo límite como al método de ensayo definitivo.

La mortalidad de los testigos, no debe sobrepasar el 10 % al final del ensayo (o un pez si se utilizan menos de 10).

La concentración de oxígeno disuelto debe ser superior al 60 % del valor de saturación, a la largo de todo el ensayo.

La concentración de la sustancia de ensayo debe ser superior al 80 % de la concentración inicial durante todo el ensayo.

Para las sustancias que se disuelven fácilmente en el medio de ensayo, produciendo soluciones estables, es decir, que no se volatilizan, degradan, hidrolizan ni adsorben en cantidad significativa, la concentración inicial puede considerarse equivalente a la concentración nominal. Se demostrará que se han mantenido las concentraciones a lo largo del ensayo y de que se han satisfecho los criterios de calidad.

En cuanto a las sustancias

(i) poco solubles en el medio de ensayo, o

(ii) capaces de formar emulsiones o dispersiones estables, o

(iii) no estables en soluciones acuosas,

se tomará como concentración inicial la concentración medida en la solución (o, si no es técnicamente posible, medida en la columna de agua) al comienzo del ensayo. La concentración se determinará tras un periodo de equilibrio pero antes de introducir los peces de ensayo.

En cualquiera de estos casos se harán mediciones complementarias, durante el ensayo, con el fin de confirmar la concentración de exposición real o que se han mantenido los criterios de calidad.

El pH no variará más de 1 unidad.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Pueden utilizarse tres tipos de procedimientos.

Ensayo estático

Ensayo de toxicidad durante el cual no hay renovación de la solución de ensayo (las soluciones no se renuevan durante todo el ensayo).

Ensayo semiestático

Ensayo sin renovación continua de la solución de ensayo, pero con renovación periódica, de las soluciones de ensayo después de periodos prolongados (por ejemplo, cada 24 horas).

Ensayo dinámico

Ensayo de toxicidad durante el cual se va renovando constantemente el agua de los recipientes de ensayo. El producto químico sometido a ensayo se transporta con el agua utilizada para renovar el medio de ensayo.

1.6.1. **Reactivos**

1.6.1.1. *Soluciones de las sustancias de ensayo*

Las soluciones madre a las concentraciones requeridas se preparan disolviendo la sustancia en agua desionizada o en agua según el punto 1.6.1.2.

Las concentraciones elegidas para el ensayo se preparan mediante dilución de la solución madre. Si se procede a un ensayo a concentraciones elevadas, la sustancia puede disolverse directamente en el agua de dilución.

En general, las sustancias se ensayarán sólo hasta su límite de solubilidad. En el caso de algunas sustancias (p. ej., aquellas que son poco hidrosolubles, que tienen un elevado P_{ow} o que forman en el agua dispersiones estables más que verdaderas soluciones), se puede aceptar una concentración de ensayo por encima del límite de solubilidad de la sustancia a fin de garantizar que se obtiene la máxima concentración soluble/estable. Es importante, sin embargo, que esta concentración no altere por otra parte el sistema de ensayo (por ejemplo, formación en la superficie del agua de una película de la sustancia que impida la oxigenación del agua, etc.)

Puede utilizarse dispersión ultrasónica, solventes orgánicos, emulgentes o dispersantes para favorecer la preparación de las soluciones madre de las sustancias poco hidrosolubles o para que dichas sustancias se dispersen mejor en el medio de ensayo. Cuando se utilicen estas sustancias auxiliares, todas las concentraciones de ensayo deberán contener la misma cantidad de sustancia auxiliar y se expondrá un lote de peces como testigo

suplementario a la misma concentración de la sustancia auxiliar que la utilizada en las series del ensayo. La concentración de esas sustancias auxiliares debe reducirse al mínimo, y en ningún caso será superior a 100 mg por litro en el medio de ensayo.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si se produjera un cambio significativo del pH, debe repetirse el ensayo ajustando el pH y registrar los resultados. En ese caso, el valor del pH de la solución madre debe ajustarse al valor del pH del agua de dilución, excepto que existan razones concretas que lo impidan. Para ajustar el pH se utilizará, preferentemente, HCl o NaOH. Este ajuste del pH debe efectuarse de forma que no se modifique significativamente la concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre. Si el ajuste ocasiona una reacción química o una precipitación física de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. *Agua de mantenimiento y de dilución*

Se podrá utilizar agua potable (no contaminada por concentraciones potencialmente peligrosas de cloro, metales pesados u otras sustancias), agua natural de buena calidad o agua reconstituida (véase el Apéndice 1). Se preferirán las aguas cuya dureza total esté comprendida entre 10 y 250 mg por litro (como $CaCO_3$), y un pH comprendido entre 6,0 y 8,5.

1.6.2. **Equipo**

El equipo debe ser de material químicamente inerte:

— sistema de dilución automático (para el ensayo dinámico),

— aparato para medir el oxígeno,

— aparato para determinar la dureza del agua,

— equipo apropiado para el control de la temperatura,

— pHmetro.

1.6.3. **Peces del ensayo**

Los peces deben gozar de buena salud y estar exentos de malformaciones visibles.

Se recomienda que la especie utilizada se elija en función de criterios prácticos como disponibilidad inmediata durante todo el año, fácil mantenimiento, comodidad para el ensayo, sensibilidad relativa a las sustancias químicas, y todos los demás factores significativos económicos, biológicos o ecológicos. Debe tenerse también en cuenta, al seleccionar la especie de peces, la necesidad de que los datos sean comparables y la existencia de una armonización internacional en vigor (referencia 1).

Las especies que se recomiendan para la realización de este ensayo figuran en el Apéndice 2; las especies preferidas son el pez cebra y la trucha.

1.6.3.1. *Mantenimiento*

Los peces que se someten al ensayo deberán provenir preferentemente de un solo lote, siendo todos los individuos de longitud y edad similares. Deben mantenerse, al menos durante 12 días, en las siguientes condiciones.

carga:

apropiada al sistema (recirculación o ensayo dinámico) y a la especie de peces,

agua:

véase 1.6.1.2,

luz:

fotoperiodo de 12 a 16 horas por día,

concentración de oxígeno disuelto:

al menos 80 % del valor de saturación,

alimentación:

diariamente o 3 veces por semana; la alimentación debe ser interrumpida 24 horas antes de comenzar el ensayo.

1.6.3.2. *Mortalidad*

Se registrará la mortalidad después de un periodo inicial de 48 horas. Se juzgará la calidad del lote según los siguientes criterios:

— mortalidad superior al 10 % de la población en 7 días:
se rechaza todo el lote,

— mortalidad al cabo de 7 días comprendida entre el 5 y el 10 % de la población:
se prolongará el período de observación 7 días más. Si no aparecen nuevas mortalidades, se admite el lote, en caso contrario debe rechazarse,

— mortalidad inferior al 5 % de la población:
se admite el lote.

1.6.4. **Adaptación**

Los peces deben mantenerse en las condiciones de ensayo (calidad y temperatura del agua), durante al menos 7 días antes de su utilización.

1.6.5. **Procedimiento del ensayo**

Antes del ensayo definitivo se puede proceder a un ensayo para determinar el intervalo de concentraciones eficaces, el cual proporcionará información sobre el intervalo de concentraciones que deberán utilizarse en el ensayo definitivo.

Se efectuará un control (o testigo), sin sustancia de ensayo y, si se considera importante, un control (o testigo) con la sustancia auxiliar, además de las concentraciones de ensayo propiamente dichas.

Se elegirá un método estático, semiestático o dinámico, en función de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de ensayo, para cumplir los criterios de calidad.

Los peces estarán expuestos a la sustancia de ensayo en las siguientes condiciones:

— duración: 96 horas,

— número de animales: al menos 7 por concentración,

— recipientes: de una capacidad apropiada, en función de la carga recomendada,

— carga: se recomienda una carga máxima de 1,0 g por litro para los ensayos estáticos y semiestáticos; para los ensayos dinámicos se puede aceptar una carga más elevada,

— concentraciónes de ensayo: al menos cinco concentraciones de ensayo que difieran en un factor constante no mayor de 2,2 y abarcando si es posible el intervalo de 0 % a 100 % de mortalidad,

— agua: véase el punto 1.6.1.2.,

— luz: fotoperíodo de 12 a 16 horas por día,

— temperatura: apropiada para la especie elegida (Apéndice 2), pero en los límites de ± 1 °C, en cualquier ensayo concreto,

— concentración en oxígeno disuelto: al menos el 60 % del valor de la saturación a la temperatura elegida,

— alimento: ninguno.

Los peces se observarán después de las 2 a 4 primeras horas y, al menos, a intervalos de 24 horas. Los peces son considerados muertos si el toque del pedúnculo caudal no produce reacción alguna y no se percibe ningún movimiento respiratorio. Los peces muertos se retirarán en el momento de cada observación y se registrará la mortalidad.

Se registrarán las anomalías visibles (por ejemplo, pérdida de equilibrio, cambios en el comportamiento natatorio, función respiratoria, pigmentación, etc.).

Diariamente se medirá el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura.

Ensayo límite

Puede realizarse un ensayo límite a 100 mg por litro, utilizando los procedimientos descritos en este método de ensayo, con el fin de demostrar que la CL_{50} es mayor que dicha concentración.

Si la naturaleza de la sustancia no permite alcanzar una concentración de 100 mg por litro en el agua de ensayo, el ensayo límite debe ser realizado a una concentración igual a la solubilidad de la sustancia (o a la máxima concentración que forme una dispersión estable) en el medio utilizado (véase también el punto 1.6.1.1).

El ensayo límite se realizará utilizando de 7 a 10 peces, y el mismo número en los controles (o testigos). (La teoría binomial indica que cuando se utilizan 10 peces y la mortalidad es cero, hay un límite de confianza del 99,9 % de que la CL_{50} es mayor que la concentración usada en el ensayo límite. Si se utilizan 7, 8 o 9 peces, la ausencia de mortalidad proporciona un límite de confianza del 99 % de que la CL_{50} es mayor que la concentración usada.)

Si aparece mortalidad, debe ser realizado un estudio completo. Si se observan efectos subletales, deben registrarse.

2. RESULTADOS Y EVALUACIÓN

Se trazará sobre papel log-probit el porcentaje de mortalidad en función de la concentración, para cada período en que se registren observaciones (24, 48, 72 y 96 horas).

Cuando sea posible y para cada tiempo de observación, se calculará la CL_{50} con sus límites de confianza ($p = 0,05$) utilizando procedimientos estandardizados; estos valores se redondearán a una o, como mucho, dos cifras significativas (ejemplos de redondeo a dos cifras: 170 en lugar de 173,5; 0,13 en lugar de 0,127; 1,2 en lugar de 1,21).

Si la pendiente de la curva de concentración/porcentaje de respuesta es demasiado acentuada como para permitir calcular la CL_{50}, bastará con una estimación gráfica de este valor.

Si dos concentraciones consecutivas, con una razón de 2,2, dan sólo 0 y 100 % de mortalidad, estos dos valores serán suficientes para indicar el rango en el que se encuentra la CL_{50}.

Si se observa que la estabilidad o la homogeneidad de la sustancia de ensayo no puede mantenerse, se mencionará en el informe y se tendrá en cuenta al interpretar los resultados.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— información acerca del pez de ensayo (nombre científico; cepa, proveedor, tratamiento previo eventual, tamaño y número utilizado en cada concentración de ensayo),

— origen del agua de dilución y sus principales características químicas (pH, dureza, temperatura),

— en el caso de una sustancia poco hidrosoluble, método de preparación de la solución madre y de las soluciones de ensayo,

— concentraciones de las eventuales sustancias auxiliares,

— relación de las concentraciones utilizadas y cualquier información disponible sobre la estabilidad, a dichas concentraciones, de la sustancia en la solución de ensayo,

— si se realizan análisis químicos, los métodos utilizados y los resultados obtenidos,

— resultados del ensayo límite, si se ha realizado,

— motivos de la elección y los detalles del procedimiento de ensayo utilizado (por ejemplo: sistema estático, semiestático, dinámico, velocidad de administración, tasa de renovación, aireación o no, carga de peces, etc.),

— descripción del equipo de ensayo,

— régimen de iluminación,

— concentraciones del oxígeno disuelto, valores de pH y temperaturas de las soluciones de ensayo cada 24 horas,

— pruebas de que se han respetado los criterios de calidad,

— tabla que muestre la mortalidad acumulada para cada concentración y para el testigo (y, en su caso, el testigo con producto auxiliar) para cada uno de los tiempos de observación recomendados,

— representación gráfica de los porcentajes de mortalidad en función de las concentraciones al final del ensayo,

— si es posible, valores de la CL_{50} en cada uno de los tiempos de observación recomendados (límite de confianza del 95 %),

— métodos estadísticos utilizados para determinar los valores de la CL_{50},

— si se utiliza una sustancia de referencia, resultados obtenidos,

— concentración máxima utilizada que no haya causado mortalidad durante el período de ensayo,

— concentración mínima utilizada que haya causado un 100 % de mortalidad durante el período de ensayo.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París 1981, Test Guideline 203, Decisión del Consejo C(81) 30 final, y actualizaciones.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1, /2 and /3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Suiza, Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia *reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Comisión de las Comunidades Europeas, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793— 821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink), American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. y Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Apéndice 1

Agua reconstituida

Ejemplo de agua de dilución adecuada

Los productos químicos deben ser de calidad analítica.

El agua debe ser agua destilada de buena calidad, o agua desionizada de una conductividad inferior a 5 μScm^{-1}.

El aparato para la destilación del agua no contendrá ningún componente de cobre.

Soluciones madres

$CaCl_2 . 2H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado): 11,76 g
disolver y enrasar a un litro con agua.

$MgSO_4 . 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): 4,93 g
disolver y enrasar a un litro con agua.

$NaHCO_3$ (carbonato ácido de sodio): 2,59 g.
disolver y enrasar a un litro con agua.

KCl (cloruro de potasio): 0,23 g
disolver y enrasar a un litro con agua.

Agua de dilución reconstituida

Mezclar 25 ml de cada una de las cuatro soluciones madre y completar hasta un litro con agua.

Airear hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea igual al valor de saturación del aire.

El pH debe ser 7,8 ± 0,2.

Si es necesario, ajustarlo con NaOH (hidróxido de sodio) o HCl (ácido clorhídrico).

El agua de dilución así preparada se deja reposar durante unas 12 horas y no debe ser aireada posteriormente.

La suma de iones Ca/Mg en esta solución es igual a 2,5 mmol/l. La relación de los iones Ca:Mg es de 4:1, la de los iones Na:K de 10:1. La alcalinidad total de esta solución es igual a 0,8 mmol/l.

Cualquier desviación en la preparación del agua de dilución no debe modificar su composición ni sus propiedades.

Apéndice 2

Especies de peces recomendadas para el ensayo

Especies recomendadas	Intervalo recomendado de temperaturas de ensayo (°C)	Longitud total recomandada del pez de ensayo (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Pez cebra	20 a 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Pez cabeza gorda	20 a 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpa común	20 a 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodontidae (Tomminck y Schlegel 1850) Medaka	20 a 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 a 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Agallas azules	20 a 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Trucha arco iris	12 a 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Caho	20 a 24	6,0 ± 2,0

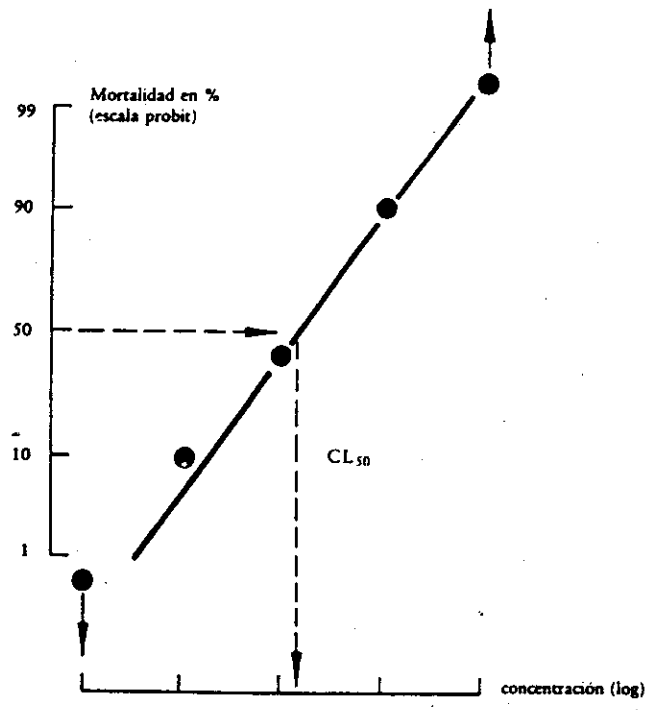
Aprovisionamiento

Los peces que se mencionan arriba son fáciles de criar y se puede disponer fácilmente de ellos durante todo el año. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en el laboratorio, en condiciones sanitarias controladas, de forma que el animal que se someta al ensayo esté sano y su origen sea conocido. Estos peces están disponibles en casi todo el mundo.

Apéndice 3

Ejemplo de curva de procentaje de mortalidad/concentración

Ejemplo de determinación de la CL_{50} en un papel log-probit



C.2. TOXICIDAD AGUDA EN DAPHNIA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

La finalidad de esta prueba es determinar la concentración efectiva media de una sustancia (CE_{50}) para la inmovilización de *Dafnia* en agua dulce. Es conveniente disponer, en la medida de lo posible, de una amplia información sobre la hidrosolubilidad, la presión de vapor, la estabilidad química, las constantes de disociación y la biodegradabilidad de la sustancia de ensayo, antes de proceder al ensayo.

Al proyectar el ensayo y al interpretar los resultados deberá tenerse en cuenta otro tipo de información suplementaria (p. ej., la fórmula desarrollada, el grado de pureza, la naturaleza y porcentaje de impurezas significativas, la presencia y cantidad de aditivos, así como el coeficiente de reparto n-octanol/agua)

1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

La exigencia de la Directiva relativa a la CL_{50} sobre la *Dafnia* se cumple mediante la determinación de la CE_{50} tal como se describe en este método de ensayo.

En este ensayo, la toxicidad aguda viene expresada por la concentración efectiva media (CE_{50}) de inmovilización, es decir, la concentración (en valor inicial) que inmoviliza al 50 % de las *Dafnia* en una seri de ensayo durante un período de exposición continua que debe establecerse.

Inmovilización:

Se consideran inmovilizados los organismos incapaces de desplazarse durante los 15 segundos siguientes a una ligera agitación del recipiente de ensayo.

Todas las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (mg/l miligramos por litro). Pueden expresarse también en peso por peso ($mg.kg^{-1}$).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia para demostrar que, en las condiciones experimentales en laboratorio, la sensibilidad de la especie utilizada no se ha modificado de forma significativa.

En el Anexo 2 se da el resumen de los resultados de una prueba interlaboratorios de la CEE, utilizando cuatro sustancias diferentes.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Puede hacerse una prueba límite a 100 mg/l para confirmar que la CE_{50} es mayor que esa concentración.

Se exponen las *Dafnia* a un abanico de concentraciones de la sustancia a ensayar añadida al agua durante 48 horas; si se usa un ensayo más corto habrá que justificarlo en el informe.

En condiciones de ensayo idénticas, y un rango adecuado de concentración de la sustancia de ensayo, diferentes concentraciones de una sustancia de ensayo ejercen efectos diferentes sobre la capacidad de movilidad de la *Dafnia*. En consecuencia, al final del ensayo, a cada concentración, corresponderá un porcentaje diferente de inmovilización de las *Dafnia*. Las concentraciones que causan una inmovilización de 0 o 100 % se determinan directamente de las observaciones del ensayo, mientras que la CE_{50} en 48 horas se determina, a ser posible, por cálculo.

Para este método se utiliza un sistema estático, así pues las soluciones de ensayo no se renuevan durante el período de exposición.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad se aplicarán tanto en el ensayo límite como en todo el método de ensayo.

La inmovilización de los testigos, al final del ensayo, no debe exceder del 10 %.

Las *Dafnia* de los grupos testigo no deben ser arrastradas hacia la superficie del agua.

Es deseable que la concentración de oxígeno disuelto en los recipientes de ensayo se mantenga por encima de 3 mg l^{-1} durante todo el ensayo. No obstante, en ningún caso debe ser inferior a 2 mg l^{-1}.

La concentración de la sustancia de ensayo debe mantenerse en un 80 % de la concentración inicial, a lo largo de todo el ensayo.

Para sustancias que se disuelven fácilmente en el medio de ensayo, produciendo soluciones estables, es decir, que no se volatilizan, degradan, hidrolizan ni adsorben en cantidad significativa, la concentración inicial puede considerarse como equivalente de la concentración nominal. Se presentarán evidencias de que se han mantenido las concentraciones a lo largo del ensayo y de que se han satisfecho los criterios de calidad.

En cuanto a las sustancias

(i) poco solubles en el medio de ensayo, o

(ii) capaces de formar emulsiones o dispersiones estables, o

(iii) no estables en soluciones acuosas,

se tomará como concentración inicial la concentración medida en la solución (o, si no es técnicamente posible, medida en la columna de agua) al comienzo de la prueba. La concentración se determinará tras un período de equilibrio, pero antes de introducir los organismos de ensayo.

En cualquiera de estos casos se harán mediciones complementarias, durante el ensayo, con el fin de confirmar la concentración de exposición real o que se han mantenido los criterios de calidad.

El pH no variará más de 1 unidad.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. Reactivos

1.6.1.1. *Soluciones de las sustancias de ensayo*

Las soluciones madre con las concentraciones requeridas se preparan disolviendo la sustancia en agua desionizada o en agua según el punto 1.6.1.2.

Las concentraciones elegidas para el ensayo se preparan mediante dilución de la solución madre. Si se procede a un ensayo con concentraciones elevadas, la sustancia puede disolverse directamente en el agua de dilución.

En general, las sustancias se probarán sólo hasta el límite de solubilidad. En el caso de algunas sustancias (p. ej., aquéllas que son poco hidrosolubles, que tienen un elevado P_{ow} o que forman en el agua dispersiones estables más que verdaderas soluciones), se puede aceptar una concentración de ensayo por encima del límite de solubilidad de la sustancia a fin de garantizar que se obtiene la máxima concentración soluble/estable. Es importante, sin embargo, que esta concentración no interfiera de cualquier otra forma en el sistema de ensayo (p. ej., formación en la superficie del agua de una película de la sustancia que impida la oxigenación del agua, etc.).

Puede utilizarse dispersión ultrasónica, disolventes orgánicos, emulgentes o dispersantes para favorecer la preparación de las soluciones madre de las sustancias poco hidrosolubles o para que dichas sustancias se dispersen mejor en el medio de ensayo. Cuando se usen estas sustancias auxiliares, todas las concentraciones de ensayo deberán contener la misma cantidad de sustancias auxiliares y se expondrá un lote de *Dafnia* como control adicional a la misma concentración de sustancia auxiliar que la utilizada en las series del ensayo. La concentración de esas sustancias auxiliares debe reducirse al mínimo, pero en ningún caso será superior a 100 mg por litro en el medio de ensayo.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. En caso de modificaciones significativas del pH, es conveniente repetir el ensayo ajustando el pH e informar de los resultados. En tal caso, el valor del pH de la solución madre debe adaptarse al valor del pH del agua de disolución, salvo que haya razones concretas que lo impidan. Para ajustar el pH se usa, preferentemente, HCl o NaOH. Este ajuste debe efectuarse de tal forma que no modifique significativamente la concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre. Si el ajuste provoca una reacción química o una precipitación física de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. *Agua para el ensayo*

En este ensayo se utiliza agua reconstituida (véase el Anexo 1 y la referencia (2): ISO 6341). Para evitar la aclimatación antes del ensayo, se recomienda que el agua utilizada para la cría sea de calidad (pH, dureza) similar al agua que se utilizará en el ensayo.

1.6.2. Equipo

Se utilizará material corriente de laboratorio. El material que entre en contacto con las soluciones de ensayo deberá ser, preferentemente, de cristal:

— aparato para medir el oxígeno (con microelectrodo o cualquier otro equipo que sea conveniente para medir el oxígeno disuelto en muestras de pequeño volumen),

— aparato adecuado para el control de la temperatura,

— pHmetro,

— aparato para determinar la dureza del agua.

1.6.3. Organismos de ensayo

La especie preferida para el ensayo es *Daphnia magna* aunque también se permite *Daphnia pulex*. Los animales de ensayo tendrán menos de 24 horas al comienzo del ensayo, criados en el laboratorio, carecerán de enfermedades aparentes y serán de origen conocido (cría, tratamientos previos, etc.).

1.6.4. Procedimiento

Antes de proceder al ensayo definitivo puede realizarse un ensayo preliminar, para obtener información sobre el rango de concentraciones que debe usarse en el ensayo definitivo.

Además de las series de ensayo debe realizarse un ensayo control sin la sustancia a ensayar y, si en su caso, un ensayo control conteniendo la sustancia auxiliar.

Las *Dafnia* se exponen a la sustancia de ensayo en las siguientes condiciones:

— *duración*: preferentemente 48 h,

— *número de animales*: al menos 20 animales por concentración de ensayo, repartidos preferentemente en cuatro lotes de 5 o en dos lotes de 10,

— *carga*: un mínimo de 2 ml de solución de ensayo para cada animal,

— *concentración de ensayo*: la solución de ensayo debe prepararse inmediatamente antes de introducir las *Dafnia*, preferiblemente sin utilizar más disolventes que el agua. Las concentraciones se calculan en serie geométrica, con una relación no superior a 2,2. Al mismo tiempo que los grupos controles, deben ensayarse concentraciones que den 0 y 100 % de inmovilización después de 48 h y una serie de resultados intermedios de inmovilización que permitan el cálculo de la CE_{50} a 48 h.

— *agua*: ver 1.6.1.2.,

— *luz*: es facultativo un fotoperiodo, luz-oscuridad

— *temperatura*: la temperatura de ensayo debe situarse entre 18 y 22 °C, pero debe mantenerse constante para cada ensayo entre ± 1 °C,

— *airéación*: no airear por borboteo las soluciones de ensayo,

— *alimentación*: ninguna.

Al final del ensayo deberá medirse el pH y la concentración de oxígeno de los controles y de todas las concentraciones de ensayo; el pH de las soluciones de ensayo no debe modificarse.

Las sustancias volátiles deben someterse a ensayo en recipientes llenos y herméticamente cerrados, suficientemente grandes como para evitar la falta de oxígeno.

Se observan las *Dafnia* al menos después de 24 horas de exposición y de nuevo al cabo de 48 horas.

Ensayo límite

Puede realizarse una prueba límite a 100 mg por litro, utilizando los procedimientos descritos en este método de ensayo, a fin de demostrar que la CE_{50} es mayor que dicha concentración.

Si la sustancia es de tal naturaleza que no se puede alcanzar la concentración de 100 mg por litro en el agua de ensayo, se hará el ensayo límite a una concentración igual a la solubilidad de la sustancia (o a la máxima concentración que forme una dispersión estable) en el medio utilizado (ver también el punto 1.6.1.1.).

El ensayo límite se hará utilizando 20 *Dafnia*, divididas en dos o cuatro lotes, con igual número en el (los) control(es). Si hay inmovilización, debe realizarse un estudio completo.

2. RESULTADOS Y EVALUACIÓN

Hay que representar en papel log-probit el porcentaje de inmovilización en función de las concentraciones, para cada período en que se recojan datos de las observaciones (24 y 48 horas).

Si los resultados lo permiten, y en cada período de observación, debe estimarse la CE_{50} y sus límites de confianza ($p = 0,05$) utilizando un método estandardizado; estos valores se redondearán a una o como máximo dos cifras significativas (ejemplos de redondeo a dos cifras: 170 en lugar de 173,5; 0,13 en lugar de 0,127; 1,2 en lugar de 1,21).

Si la pendiente de la curva concentración/porcentaje de respuesta es demasiado inclinada como para permitir calcular la CE_{50}, bastará con dar una estimación gráfica de este valor.

Cuando dos concentraciones inmediatamente consecutivas, en una relación 2,2, sólo den 0 y 100 % de inmovilización, bastarán estos dos valores para indicar el intervalo en que se sitúa la CE_{50}.

Si se comprueba que la estabilidad o la homogeneidad de la sustancia de ensayo no puede mantenerse, se interpretarán los resultados con prudencia y se indicará en el informe.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— información acerca del organismo sometido a ensayo (nombre científico, estirpe, proveedor u origen, tratamiento previo eventual, método de cría, incluyendo el origen y la clase, cantidad y frecuencia de la alimentación),

— origen del agua de dilución y sus principales características químicas (es decir, pH, temperatura, dureza),

— en caso de sustancias de baja hidrosolubilidad, método de preparación de las soluciones madre y de las soluciones de ensayo,

— concentración de cualquier sustancias auxiliares utilizadas,

— concentraciones utilizadas y cualquier información disponible sobre la estabilidad, a dichas concentraciones, de las sustancias ensayadas en la solución de ensayo,

— si se han realizado análisis químicos, los métodos utilizados y los resultados obtenidos,

— resultados del ensayo límite, si lo hay,

— descripción del equipo de ensayo,

— información acerca de la iluminación,

— concentraciones del oxígeno disuelto, valores del pH y temperatura de las soluciones de ensayo,

— evidencia de que se han cumplido los criterios de calidad,

— tabla mostrando la inmovilización acumulada en el ensayo control (y en el control con sustancia auxiliar si se ha utilizado) y en cada concentración de ensayo, para los periodos de observación recomendados (24 y 48 horas),

— representación gráfica de los porcentajes de respuesta en relación con las concentraciones al final del ensayo,

— si es posible, valores de la CE_{50} para cada periodo de observación recomendado (con un límite de confianza del 95 %),

— métodos estadísticos utilizados para determinar el valor de la CE_{50},

— si se utiliza una sustancia de referencia, resultados obtenidos;

— concentración más alta ensayada que no haya originado ninguna inmovilización durante el periodo de ensayo,

— concentración más baja ensayada que haya provocado un 100 % de inmovilización durante el periodo de ensayo.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE, París 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30, final and updates.

(2) International Standard ISO, Water Quality — Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna Straus*, ISO 6341-1989

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea) NFT 90 301 (January 1983).

(4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. y Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

(6) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K.

(7) Litchfield, J. T. y Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments, J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.

(8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, vol. 3, 793-821.

(9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM, 1977, STP 634, 65-84.

(11) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. y Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Anexo 1

Agua reconstituida

Ejemplo de agua de dilución idónea (según norma ISO 6341)

Todos los productos químicos deben ser de calidad analítica.

El agua debe ser un agua destilada de buena calidad, o agua desionizada de una conductividad inferior a 5 μScm^{-1}.

El aparato de destilación del agua no tendrá ningún componente de cobre.

Soluciones madre

$CaCl_2 . 2 H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado): disolver en agua y completar hasta un litro.	11,76 g
$NaHCO_3$ carbonato ácido de sodio): disolver en agua y completar hasta un litro.	2,59 g
$MgSO_4.7 H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): disolver en agua y completar hasta un litro.	4,93 g
KCl (cloruro de potasio): disolver en agua y completar hasta un litro.	0,23 g

Agua de dilución reconstituida

Mezclar 25 ml de cada una de las cuatro soluciones madre y completar hasta un litro con agua.

Airear hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea igual al valor de saturación del aire.

El pH debe ser 7,8 ± 0,2.

Si es necesario, ajustarlo con NaOH (hidróxido de sodio) o HCl (ácido clorhídrico).

El agua de dilución así preparada se deja reposar durante unas 12 horas y no necesita ser aireada posteriormente.

La suma de iones Ca/Mg en esta solución es igual a 2,5 mmol/l. La relación de los iones Ca:Mg es de 4:1, la de los iones Na:K de 10:1. La alcalinidad total de esta solución es igual a 0,8 mmol/l.

Cualquier modificación en la preparación del agua de dilución no debe cambiar su composición ni sus propiedades.

Anexo 2

PRUEBA INTERLABORATORIO DE LA CEE

Resumen de los resultados de una prueba interlaboratorios de la CEE realizada en 1978

(citada también en la referencia 2)

Observación: el objeto de esta prueba interlaboratorios fue la determinación de la CE_{50} *a 24 horas*

Sustancias utilizadas:

1) Dicromato potásico

2) Acido tetrapropilbencenosulfónico

3) Sal sódica del ácido tetrapropilbencenosulfónico

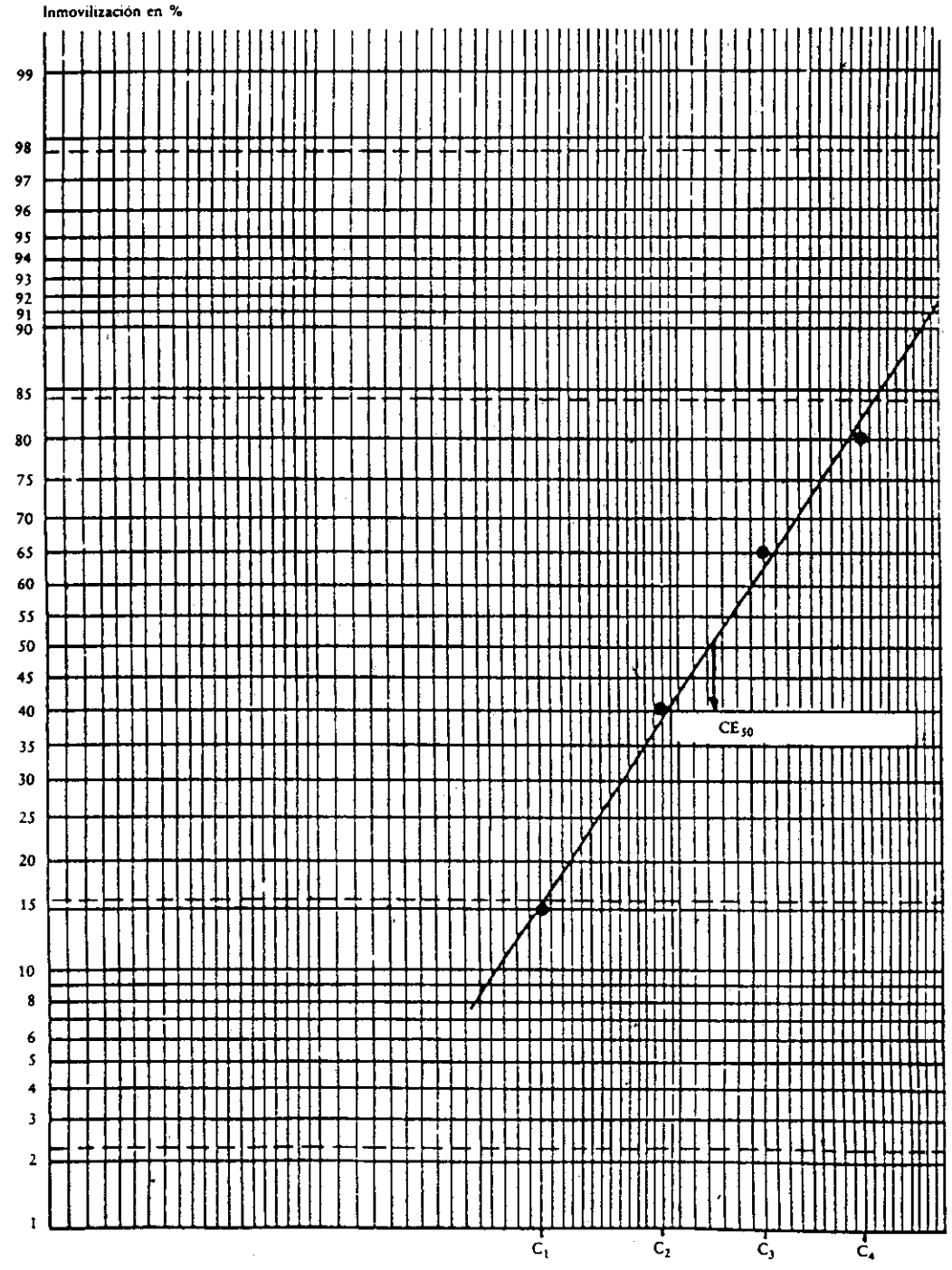
4) Sal potásica del ácido tricloro-2,4,5-fenoxiacético

Sustancia	Número de laboratorios participantes	Número de resultados para el cálculo	CE_{50}-24 h mg/l media
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Anexo 3

Ejemplo de curva de concentración: porcentaje de inmovilización

Ejemplo de determinación de la CE_{50} utilizando papel log-probit



C.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ALGAS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este ensayo es determinar los efectos de una sustancia sobre el crecimiento de una especie de alga verde unicelular. Ensayos relativamente breves (72 horas) pueden valorar los efectos sobre varias generaciones. Este método puede adaptarse para ser utilizado con diferentes especies de algas unicelulares, en cuyo caso se proporcionará, junto con el informe del ensayo, una descripción del método utilizado.

Este método se aplica más fácilmente a sustancias hidrosolubles las cuales, en las condiciones del ensayo, van a permanecer probablemente en el agua.

El método puede ser utilizado para sustancias que no interfieren directamente con la medición del crecimiento de las algas.

Es conveniente disponer, si es posible, de información sobre la hidrosolubilidad, presión de vapor, estabilidad química, constantes de disociación y biodegradabilidad de las sustancias antes de comenzar el ensayo.

Debe tenerse en cuenta, tanto en la planificación de la prueba como en la interpretación de sus resultados, otro tipo de información adicional (por ejemplo, fórmula estructural, el grado de pureza, la naturaleza y el porcentaje de impurezas significativas, la presencia y cantidad de aditivos y el coeficiente de reparto n-octanol/agua).

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Densidad celular: número de células por mililitro.

Crecimiento: incremento de la densidad celular durante el período de ensayo.

Tasa de crecimiento: incremento de densidad celular por unidad de tiempo.

CE_{50}: en este ensayo, es la concentración de la sustancia de ensayo que da lugar a una reducción del 50 %, bien en el crecimiento ($C_{50}E_b$) bien en la tasa de crecimiento ($C_{50}E_r$) con respecto al testigo.

NOEC (concentración sin efecto observado): en este método, es la mayor concentración ensayada en la que no se observa una inhibición significativa del crecimiento respecto al testigo.

Todas las concentraciones de las sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (miligramos por litro). Pueden expresarse también en peso por peso ($mg.kg^{-1}$).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia para demostrar que, en las condiciones de ensayo en laboratorio, la sensiblidad de la especie utilizada no se ha modificado de forma significativa.

Si se utiliza una sustancia de referencia, deben darse los resultados en el informe del ensayo. Puede utilizarse dicromato potásico como sustancia de referencia, pero su color puede afectar a la calidad e intensidad de la luz disponibles para las células, así como a las determinaciones espectrofotométricas, si se utilizan. Se ha usado el dicromato potásico en un ensayo internacional inter-laboratorios (véanse la referencia 3 y el Apéndice 2).

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Puede realizarse un ensayo límite a 100 mg/l a fin de demostrar que la CE_{50} es mayor que esa concentración.

Se exponen cultivos de algas verdes seleccionadas en fase exponencial de crecimiento a diversas concentraciones de la sustancia de ensayo durante varias generaciones bajo condiciones definidas.

Las soluciones de ensayo se incuban durante un periodo de 72 horas, durante el cual se mide la densidad celular en cada una de ellas al menos cada 24 horas. Se determina la inhibición del crecimiento en relación a un cultivo testigo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad se aplicarán tanto en el ensayo límite como en todo el método de ensayo.

La densidad celular en los cultivos testigo debe aumentar en un factor de al menos 16 en 3 días.

La concentración de la sustancia de ensayo debe mantenerse dentro del 80 % de la concentración inicial durante toda la duración del ensayo.

En el caso de sustancias que se disuelven fácilmente en el medio de ensayo, produciendo soluciones estables, es decir, que no se volatilizan, degradan, hidrolizan ni adsorben en cantidad significativa, la concentración inicial puede considerarse como equivalente a la concentración nominal. Debe evidenciarse que se han mantenido las concentraciones a lo largo del ensayo y de que se han satisfecho los criterios de calidad.

En cuanto a las sustancias

(i) poco solubles en el medio de ensayo, o

(ii) capaces de formar emulsiones o dispersiones estables, o

(iii) no estables en solución acuosa, se tomará como concentración inicial la concentración medida en la solución al comienzo del ensayo. La concentración se determinará tras un período de equilibrio.

En cualquiera de estos casos se harán mediciones complementarias, durante el ensayo, con el fin de confirmar la concentración de exposición real o que se han mantenido los criterios de calidad.

Se admite que durante el período del ensayo se incorporan a la biomasa algal, cantidades significativas de la sustancia de ensayo. Por ello, a fin de demostrar conformidad con los criterios de calidad anteriormente mencionados, se tendrá en cuenta tanto la cantidad de sustancia incorporada a la biomasa algal como la sustancia en solución (o, si no es posible técnicamente, medida en la columna de agua). No obstante, como la determinación de la concentración de la sustancia en la biomasa algal puede plantear problemas técnicos importantes, puede demostrarse que se han cumplido los criterios de calidad con un recipiente de ensayo que contenga la sustancia a la concentración más elevada pero sin algas y midiendo las concentraciones en la solución (o, si no es posible técnicamente, en la columna de agua) al comienzo y al final del período de ensayo.

1.6. DESCRIPCION DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. Reactivos

1.6.1.1. *Soluciones de las sustancias de ensayo*

Las soluciones madre a las concentraciones requeridas se preparan disolviendo la sustancia en agua desionizada o en agua que responda a las condiciones establecidas en el punto 1.6.1.2.

Las concentraciones de ensayo elegidas se preparan añadiendo partes alícuotas adecuadas a precultivos de algas (véase el Apéndice 1). En general, las sustancias se ensayarán sólo hasta el límite de su solubilidad. En el caso de algunas sustancias (p. ej., aquéllas que son poco hidrosolubles, que tienen un elevado P_{ow} o que forman en el agua dispersiones estables más que verdaderas soluciones), se puede aceptar una concentración de ensayo por encima del límite de solubilidad de la sustancia a fin de garantizar que se obtiene la máxima concentración soluble/estable. Es importante, sin embargo, que esta concentración no altere por otra parte el sistema de ensayo (p ej., formación en la superficie del agua de una película de la sustancia qúe impida la oxigenación del agua, etc.).

Puede utilizarse dispersión ultrasónica, solventes orgánicos, emulgentes o dispersantes para favorecer la preparación de las soluciones madre de las sustancias poco hidrosolubles o para que dichas sustancias se dispersen mejor en el medio de ensayo. Cuando se usen estas sustancias auxiliares, todas las concentraciones de ensayo deberán contener la misma cantidad de producto auxiliar y se expondrán testigos adicionales a la misma concentración del producto auxiliar que la utilizada en las series del ensayo. La concentración de estas sustancias auxiliares debe reducirse al mínimo, y en ningún caso será superior a 100 mg por litro en el medio de ensayo.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si se produjera un cambio significativo del pH, debe repetirse el ensayo ajustando el pH y registrar los resultados. En ese caso, el valor del pH de la solución madre debe ajustarse al valor del pH del agua de dilución, excepto que existen razones concretas que lo impidan. Para ajustar el pH se utilizará, preferentemente, HCl o NaOH. Este ajuste del pH debe efectuarse de tal forma que no se modifique significativamente la concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre. Si el ajuste ocasiona una reacción química o una precipitación física de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. *Medio de ensayo*

El agua debe ser agua destilada de buena calidad, o agua desionizada de una conductividad inferior a 5 $\mu S.cm^{-1}$. El aparato para la destilación del agua no contendrá ningún componente de cobre.

Se recomienda el medio siguiente.

Se preparan cuatro soluciones madre, de acuerdo con la tabla siguiente. Las soluciones madre se esterilizan por filtración en membrana o por autoclave, y se conservan en la oscuridad a 4 °C. La solución madre nº 4 se esterilizará sólo por filtración en membrana. Estas soluciones madre se diluirán para conseguir las concentraciones finales de nutrientes en las soluciones de ensayo.

Nutriente	Concentración en la solución madre		Concentración final en la solución de ensayo	
Solución madre 1: macronutrientes				
NH_4Cl	1,5	g/l	15	mg/l
$MgCl_2.6H_2O$	1,2	g/l	12	mg/l
$CaCl_2.2H_2O$	1,8	g/l	18	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	1,5	g/l	15	mg/l
KH_2PO_4	0,16	g/l	1,6	mg/l
Solución madre: Fe-EDTA				
$FeCl_3.6H_2O$	80	mg/l	0,08	mg/l
$Na_2EDTA.2H_2O$	100	mg/l	1	mg/l
Solución madre 3: elementos traza				
H_3BO_3	185	mg/l	0,185	mg/l
$MnCl_2.4H_2O$	415	mg/l	0,415	mg/l
$ZnCl_2$	3	mg/l	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	1,5	mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2.2H_2O$	0,01	mg/l	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	7	mg/l	7×10^{-3}	mg/l
Solución madre 4: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

El pH del medio, después del equilibrio con el aire, es aproximadamente 8.

1.6.2. **Equipo**

— Equipo normal de laboratorio.

— Matraces de ensayo de volumen adecuado (por ejemplo, serán adecuados matraces cónicos de 250 ml cuando el volumen de la solución de ensayo sea de 100 ml). Todos los matraces de ensayo serán idénticos en cuanto a material y dimensiones.

— Equipo de cultivo: cámara en la que pueda mantenerse una temperatura de 21 a 25 °C con una oscilación de ± 2 °C, y con una iluminación uniforme continua, que proporcione un rango espectral de 400 a 700 nm. Si las algas en los cultivos testigo alcanzan las tasas de crecimiento recomendadas, puede suponerse que las condiciones para el crecimiento, incluida la intensidad luminosa, han sido adecuadas.

Se recomienda utilizar, en el nivel medio de las soluciones de ensayo, una intensidad luminosa en el rango de 60 a 120 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (35 a 70 × 10^{18} fotones.$m^{-2}.s^{-1}$) medida en el rango de 400 a 700 nm utilizando un receptor adecuado. Cuando se utilizan instrumentos de medición de luminosidad calibrados en lux, se puede aceptar un rango equivalente de 6 000 a 10 000 lux.

Puede obtenerse la intensidad luminosa utilizando de 4 a 7 lámparas fluorescentes de 30 W del tipo blanco universal (temperatura de color de aproximadamente 4 000 K), a una distancia de 0,35 m del cultivo de algas.

— Las mediciones de densidad celular se harán utilizando un método directo de recuento de células vivas, por ejemplo, un microscopio con cámaras de recuento. No obstante, pueden utilizarse otros procedimientos (fotometría, turbidimetría, ...) si son suficientemente sensibles y si muestran una correlación suficientemente buena con la densidad celular.

1.6.3. **Organismos de ensayo**

Se sugiere que las especies de algas verdes utilizadas sean especies de crecimiento rápido adecuadas para cultivo y ensayo. Se prefieren las especies siguientes:

— *Selenastrum capricornutum*, por ejemplo, ATCC 22662 or CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus*, por ejemplo, 86.81 SAG,

Nota:

ATCC = American Type Culture Collection (EEUU)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (G.B.)

SAG = Colección de cultivos de algas (Gotinga, RFA)

Si se utilizan otras especies, deben mencionarse las cepas en el informe.

1.6.4. **Procedimiento del ensayo**

Basándose en los resultados de las pruebas de tanteo se determinará el intervalo de concentraciones en el que se espera que ocurran los efectos.

Las dos medidas de crecimiento (biomasa y tasa de crecimiento) pueden dar lugar a medidas muy divergentes de inhibición de crecimiento; deben utilizarse ambas en la prueba de tanteo de rango para garantizar que la progresión geométrica de las concentraciones permitirá el cálculo de la $C_{50}E_b$ y $C_{50}E_r$.

Densidad celular inicial

Se recomienda que la densidad celular inicial en los cultivos de ensayo sea de aproximadamente 10^4 células/ml para *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus subspicatus*. Cuando se utilicen otras especies, la biomasa será comparable.

Concentraciones de la sustancia de ensayo

Para este ensayo se utilizarán al menos cinco concentraciones en progresión geométrica con un factor que no exceda de 2,2. La concentración mínima ensayada no tendrá efectos observables sobre el crecimiento de las algas. La concentración máxima ensayada inhibirá el crecimiento al menos un 50 % en relación con el testigo y, preferentemente, detendrá completamente el crecimiento.

Réplicas y controles

Cada concentración de ensayo incluirá tres réplicas. Se harán tres controles sin sustancia de ensayo y, si procede, tres controles que contengan la sustancia auxiliar. La prueba podrá modificarse, si se justifica, para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración.

Realización del ensayo

Los cultivos de ensayo que contienen las concentraciones deseadas de la sustancia de ensayo y la cantidad deseada de inóculo de algas se preparan añadiendo partes alícuotas de soluciones madre de la sustancia de ensayo a cantidades adecuadas de precultivosde algas (véase el Apéndice 1).

Se agitan los matraces de ensayo y se colocan en el aparato de cultivo. Se mantienen las algas en suspensión mediante agitación, removiendo o con burbujeo de aire, para facilitar el intercambio de gases y reducir la variación del pH en las soluciones de ensayo. Los cultivos deberán mantenerse a una temperatura entre los 21 y los 25 °C, con variaciones máximas de ± 2 °C.

La densidad celular en cada matraz se determinará al menos a las 24, 48 y 72 horas después del comienzo del ensayo. Se utilizará el medio de cultivo de algas filtrado conteniendo la concentración adecuada del producto de ensayo para determinar el fondo, cuando se utilicen mediciones de densidad celular distintas de los métodos de recuento directo.

El pH se medirá al comienzo del ensayo y a las 72 horas.

El pH de los controles no debe desviarse, en general, más de 1,5 unidades durante el ensayo.

Ensayo de sustancias volátiles

Actualmente, no existe una forma generalmente aceptada para ensayar sustancias volátiles. Cuando se conozca que una sustancia tiende a volatilizarse, se podrán utilizar matraces cerrados con aumento del espacio superior (de cabeza). Hay que tener en cuenta la posibilidad de que falte CO_2 cuando se calcule el espacio superior (de cabeza) de los matraces cerrados. Se han propuesto variaciones a este método (véase la referencia (4)).

Se debe intentar determinar la cantidad de sustancia que permanence en solución, y se aconseja gran precaución cuando se interpreten las ensayos de las pruebas con sustancias químicas si se usan sistemas cerrados.

Ensayo límite

Utilizando los procedimientos descritos en este método, puede realizarse un ensayo límite a 100 mg por litro a fin de demostrar que la CE_{50} es mayor que esa concentración.

Si la naturaleza de la sustancia no permite alcanzar una concentración de 100 mg por litro en el agua de ensayo, el ensayo límite debe ser realizado a una concentración igual a la solubilidad de la sustancia (o a la concentración máxima que forme una dispersión estable) en el medio usado (véase también el punto 1.6.1.1.).

El ensayo límite debe ser realizado al menos por triplicado, con el mismo número de testigos. Deben usarse para el ensayo límite las dos medidas de crecimiento (biomasa y tasa de crecimiento).

Si se encuentra en un ensayo límite una disminución media igual o superior al 25 % en la biomasa o en la tasa de crecimiento, en relación con el testigo, debe llevarse a cabo un ensayo completo.

2. RESULTADOS Y EVALUACIÓN

Se tabularán las medidas de densidad celular en los cultivos de ensayo y en los controles, junto con las concentraciones de la sustancia de ensayo y los tiempos a los que se realizan las determinaciones. Se hará una gráfica del valor medio de la densidad celular para cada concentración de sustancia de ensayo, así como para los testigos, en función del tiempo (0-72 horas), a fin de conseguir curvas de crecimiento.

Para determinar la relación concentración/efecto, pueden utilizarse los dos enfoques siguientes. Algunas sustancias pueden estimular el crecimiento a bajas concentraciones. Sólo se tendrán en cuenta los datos que indiquen una inhibición entre 0 y 100 %.

2.1. COMPARACIÓN DE LAS ÁREAS BAJO LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

El área entre las curvas de crecimiento y la línea horizontal $N = N_0$ puede calcularse de acuerdo con la fórmula:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

en la que:

A = área,

N_0 = número de células/ml en el momento t_0 (comienzo del ensayo,

N_1 = número medido de células/ml a t_1,

N_n = número medido de células/ml a t_n,

t_1 = tiempo en que se realiza la primera medida tras el comienzo del ensayo,

t_n = tiempo en que se realiza la medida n tras el comienzo del ensayo,

n = n = número de medidas hechas tras el comienzo del ensayo.

El porcentaje de inhibición del crecimiento celular para cada concentración de sustancia de ensayo (I_A) se calculará de acuerdo con la fórmula:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

donde:

A_c = área entre la curva de crecimiento del testigo y la línea horizontal $N = N_0$.

A_t = área entre la curva de crecimiento a la concentración t y la línea horizontal $N = N_0$.

Los valores I_A se representarán en una gráfica en papelsemilogarítmico o en papel probit semilogarítmico en función de las concentraciones correspondientes. Si la gráfica se hace en papel probit, se unirán los puntos con una línea recta, bien de forma aproximada o mediante una regresión por ordenador.

La CE_{50} se calcula a partir de la línea de regresión leyendo la concentración equivalente a la inhibición del 50 % (I_A = 50 %). Para expresar este valor de forma inequívoca en relación a este método de cálculo, se propone utilizar el símbolo $C_{50}E_b$. Es esencial que $C_{50}E_b$ vaya acompañada del período adecuado de exposición, por ejemplo, $C_{50}E_b$ (0-72 horas).

2.2. COMPARACION DE LAS TASAS DE CRECIMIENTO

La tasa media de crecimiento específico (μ) de los cultivos con crecimiento exponencial puede calcularse como

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

donde t_0 es el momento del comienzo del ensayo.

Por otra parte, la tasa media de crecimiento específico puede derivarse de la pendiente de la línea de regresión en una gráfica de ln N en función del tiempo.

El porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento específico para cada concentración de la sustancia de ensayo ($I_{\mu t}$) se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

donde

μ_c = tasa media de crecimiento específico de los testigos

μ_t = tasa media de crecimiento específico a la concentración de ensayo t

El porcentaje de inhibición de la tasa media de crecimiento específico para cada concentración de sustancia de ensayo en relación con el valor de los testigos se representará en una gráfica en función de logaritmo de la concentración. La CE_{50} puede leerse en la gráfica resultante. Para expresar de forma inequívoca la CE_{50} obtenida por este método se propone utilizar el símbolo $C_{50}E_r$. Deben indicarse los momentos de medición, por ejemplo, si el valor de refiere a los momentos 0 y 72 horas, el símbolo será $C_{50}E_r$ (0-72 horas).

Nota: La tasa de crecimiento específico es un término logarítmico, y pequeños cambios en la tasa de crecimiento pueden dar lugar a grandes cambios en la biomasa. Por ello, CE_b y CE_r son valores que no pueden compararse numéricamente.

2.3. CÁLCULO DE LA NOEC

La concentración sin efecto observado se determina mediante un procedimiento estadístico adecuado por comparación de muestras múltiples (p. ej., análisis de la varianza y prueba de Dunnett), utilizando los valores de las áreas bajo las curvas de crecimiento A (véase el punto 2.1) o las tasas de crecimiento específico μ (véase el punto 2.2) correspondientes a cada réplica individual.

3. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

- sustancia de ensayo: datos de identificación química,
- organismos de ensayo: origen, cultivo de laboratorio, número de cepa, método de cultivo,
- condiciones del ensayo:
  - fecha del comienzo y del final del ensayo y su duración,
  - temperatura,
  - composición del medio,
  - equipo de cultivo,
  - pH de las soluciones al comienzo y al final del ensayo (si se observa una diferencia de pH superior a 1,5 unidades, deberá adjuntarse explicación),
  - vehículos y métodos utilizados para disolver la sustancia de ensayo y concentración del vehículo en las soluciones de ensayo,
  - calidad e intensidad de la luz,
  - concentraciones ensayadas (medidas o nominales),
- resultados:
  - densidad celular para cada matraz a cada tiempo de medición y método para medir la densidad celular,
  - valores medios de densidad celular,
  - curvas de crecimiento,
  - representación gráfica de la relación concentración/efecto,
  - valores de CE y método de cálculo,
  - NOEC,
  - otros efectos observados.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81)30 Final.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

(3) ISO 8692 — Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

(4) S. Galassi y M. Vighi — Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123-1126.

Apéndice 1

Ejemplo de procedimiento para el cultivo de algas

Observaciones generales

El objetivo del cultivo mediante el siguiente procedimiento es el de obtener cultivos de algas para ensayos de toxicidad.

Deberán utilizarse métodos apropiados que garanticen que los cultivos de algas no están contaminados por bacterias (ISO 4833). Puede ser conveniente utilizar cultivos axénicos, pero serán esenciales los cultivos de una sola especie de alga.

Todas las operaciones deberán llevarse a cabo en condiciones estériles, con el fin de evitar la contaminación por bacterias u otras especies de algas. Se eliminarán los cultivos contaminados.

Procedimiento para la obtención de algas

Preparación de soluciones nutritivas (medios)

El medio se puede preparar por dilución de las soluciones madre concentradas de nutrientes. Para un medio sólido, se añadirá un 0,8 % de agar. El medio utilizado sera estéril. La esterilización por autoclave puede dar pérdida de NH_3.

Cultivos de inóculo

Los cultivos de inóculo son pequeños cultivos de algas que se trasfieren periódicamente a un medio de cultivo fresco para que actúen como elemento inicial del ensayo. Si los cultivos no se utilizan regularmente, se mantienen en tubos de agar inclinado y se transfieren a un medio fresco al menos cada dos meses.

Los cultivos de inóculo se cultivan en matraces cónicos que contengan el medio apropiado (un volumen alrededor de 100 ml). Cuando las algas se incuban a 20 °C con iluminación continua, será necesario hacer una transferencia semanal.

Durante la transferencia se llevará, con pipetas estériles, una cantidad de cultivo «viejo» a matraces con medio fresco, de manera que, con las especies de crecimiento rápido, la concentración inicial sea unas 100 veces menor que en el cultivo viejo.

La tasa de crecimiento de una especie puede determinarse a partir de la curva de crecimiento. Si se conoce, será posible calcular la densidad a la cual deberá transferirse el cultivo al nuevo medio. Esto deberá realizarse antes de que el cultivo alcance su fase letal.

Precultivo

El precultivo está concebido para obtener una cantidad apropiada de algas para la inoculación de los cultivos de ensayo. Dicho precultivo deberá incubarse en las condiciones del ensayo y se utilizará cuando esté aún en fase de crecimiento exponencial, normalmente después de un período de incubación de 3 días. Si los cultivos de algas contienen células deformadas o anormales, deberán eliminarse.

Apéndice 2

La norma ISO 8692: Calidad del agua; prueba de inhibición del crecimiento de algas en agua dulce utilizando *Scenedesmus subspicatus* y *Selenastrum capricornutum* da los siguientes resultados en una prueba multicéntrica llevada a cabo por 16 laboratorios, utilizando como sustancia de prueba el dicromato potásico.

	Medias (mg/l)	Rango (mg/l)
$C_{50}E_r$ (0-72 h)	0,84	de 0,60 a 1,03
$C_{50}E_b$ (0-72 h)	0,53	de 0,20 a 0,75

C.4. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD -FACIL-

PARTE I. CONSIDERACIONES GENERALES

I.1. INTRODUCCIÓN

Se describen seis métodos de ensayo que permiten detectar la biodegradabilidad fácil de los productos químicos en medio acuoso aerobio:

(a) Pérdida de carbono orgánico disuelto (COD) (Método C.4-A)

(b) Prueba de detección de la OCDE modificada — Pérdida de COD (Método C.4-B)

(c) Desprendimiento de dióxido de carbono (CO_2) (prueba de Sturm modificada) (Método C.4-C)

(d) Respirometría manométrica (Método C.4-D)

(e) Frasco cerrado (Método C.4-E)

(f) MITI (Ministerio de Industria y Comercio Internacional de Japón) (Método C.4-F).

En la Parte I del presente método se recogen consideraciones generales y consideraciones comunes a los seis ensayos. Los aspectos específicos de los distintos métodos se tratan en las Partes II a VII. Los Anexos contienen definiciones, fórmulas y material complementario.

Un estudio comparativo interlaboratorios, realizado por la OCDE en 1988, demostró la homogeneidad de los resultados obtenidos con estos métodos. Sin embargo, las características físicas de la sustancia problema pueden hacer que se prefiera un método a los otros.

I.2. SELECCIÓN DEL MÉTODO ADECUADO

Para seleccionar el método más adecuado es fundamental poseer información sobre la solubilidad, presión de vapor y características de absorción del producto químico. Debería conocerse la estructura química o la fórmula para calcular los valores teóricos o comprobar los valores obtenidos en las mediciones de parámetros, como DTO, CO_2T, COD, COT o DQO (véanse los Anexos I y II).

Las sustancias problema con una hidrosolubilidad no inferior a 100 mg/l pueden estudiarse con cualquier método, siempre que no sean volátiles ni sufran absorción. En el cuadro 1 se indican los métodos adecuados para los productos químicos poco hidrosolubles, volátiles o que sufran absorción. En el Anexo III se describe cómo pueden tratarse las sustancias poco hidrosolubles y las volátiles. Las sustancias moderadamente volátiles pueden estudiarse con el método de pérdida de COD si hay bastante espacio para el gas en los recipientes utilizados (que debieran estar convenientemente cerrados). En este caso, es necesario utilizar un control abiótico para tener en cuenta las posibles pérdidas físicas.

Cuadro 1: Aplicabilidad de los métodos de ensayo

Prueba	Método analítico	Adecuación para sustancias:		
		poco solubles	volátiles	adsorbibles
Pérdida de COD	Carbono orgánico disuelto	—	—	+ / –
Pérdida OECD mod.	Carbono orgánico disuelto	—	—	+ / –
Desprendim. de CO_2	Respirometría: desprendimiento de CO_2	+	—	+
Respirometría manométrica	Respirometría manométrica: consumo de oxígeno	+	+ / –	+
Frasco cerrado	Respirometría: oxígeno disuelto	+ / –	+	+
MITI	Respirometría: consumo de oxígeno	+	+ / –	+

Es necesario disponer de información sobre la pureza o las proporciones relativas de los principales componentes del producto problema para interpretar los resultados obtenidos, especialmente cuando éstos son bajos o dudosos.

El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para bacterias (Anexo IV) puede ser muy útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de la biodegradación.

I.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Para comprobar el procedimiento se someten a ensayo sustancias de referencia que cumplan los criterios de biodegradabilidad fácil; para ello se introduce, en paralelo con el ensayo a realizar, una muestra con la sustancia de referencia adecuada.

La anilina (recién destilada), el acetato sódico y el benzoato sódico son sustancias adecuadas. Todas estas sustancias de referencia se degradan con estos métodos aunque no se añada inóculo deliberadamente.

Se pensó en buscar una sustancia de referencia que fuera fácilmente biodegradable pero que necesitara para su biodegradación la adición de inóculo. Se ha propuesto el uso del ftalato ácido de potasio pero es necesario disponer de más información sobre esta sustancia antes de que pueda ser aceptada como sustancia de referencia.

En el ensayo respirométrico, los compuestos que contengan nitrógeno pueden afectar a la captación de oxígeno debido a la nitrificación (véanse los Anexos II y V).

I.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO

Se inocula una solución o suspensión de la sustancia problema en un medio mineral y se incuba en condiciones aerobias en la oscuridad o bajo luz difusa. La cantidad de COD en la solución problema debida al inóculo debería mantenerse lo más baja posible respecto a la cantidad de COD debida a la sustancia problema.

Para tener en cuenta la actividad endógena del inóculo, se realizan ensayos paralelos en blanco, que contienen inóculo pero sin sustancia problema, si bien la actividad endógena de las células en presencia de la sustancia no corresponderá exactamente con la del control endógeno. Se trabajará en paralelo con una sustancia de referencia para controlar el funcionamiento de los procedimientos.

En general, la degradación se sigue mediante la determinación de parámetros, como el COD, la producción de CO_2 y el consumo de oxígeno, tomando medidas con la frecuencia suficiente para permitir la identificación del comienzo y de la finalización de la biodegradación. Con los repirómetros automáticos, la medición es continua. El COD se mide a veces junto con otro parámetro, pero esto suele hacerse sólo al principio y al final del ensayo. También puede utilizarse el análisis químico específico para evaluar la degradación primaria de la sustancia problema y determinar la concentración de las sustancias intermedias formadas eventualmente (esto es obligatorio en la prueba del MITI).

El ensayo dura normalmente 28 días. Sin embargo, es posible terminar los ensayos antes del día 28, por ejemplo en el caso de que la curva de biodegradación haya alcanzado un nivel constante en, al menos, 3 determinaciones. También es posible prolongar los ensayos más de 28 días cuando la curva indique que la biodegradación se ha iniciado pero sin que se haya alcanzado el nivel constante el día 28.

I.5. CRITERIOS DE CALIDAD

I.5.1. Reproducibilidad

Debido a la naturaleza de la biodegradación y de las poblaciones bacterianas mixtas utilizadas como inóculos, las determinaciones deben realizarse al menos por duplicado.

La experiencia indica que la variación entre duplicados será menor cuanto mayor sea la concentración de microorganismos añadida inicialmente al medio de ensayo. También se ha visto en estudios interlaboratorios que pueden darse grandes variaciones entre los resultados obtenidos por diferentes laboratorios; no obstante, con los compuestos químicos que son fácilmente biodegradables se obtienen normalmente resultados concordantes.

1.5.2. **Validez del ensayo**

Un ensayo se considera válido si la máxima diferencia entre los duplicados respecto a los valores de la eliminación de la sustancia problema en la parte de la gráfica en forma de meseta, al final del test o al final del periodo de diez días, es inferior al 20 % y si la degradación porcentual de la sustancia de referencia alcanza el nivel de biodegradabilidad fácil antes de los 14 días. Si no se cumple alguna de estas condiciones, es necesario repetir el ensayo. Debido al rigor de los métodos, la obtención de bajos porcentajes de biodegradación no significa necesariamente que la sustancia problema no sea biodegradable en condiciones ambientales, sino que indica que será necesario realizar más estudios para establecer la biodegradabilidad.

Si en un ensayo de toxicidad, realizado con la sustancia problema junto con una sustancia de referencia, se obtiene en 14 días menos del 35 % de degradación (según el COD) o menos del 25 % (según la DTO o el CO_2T), se supone que la sustancia de ensayo es inhibidora (véase también el Anexo IV). La serie de ensayo debe repetirse, a ser posible, utilizando una concentración inferior de sustancia problema o una concentración superior de inóculo, que no exceda de 30 mg de sólidos/litro.

1.6. PREPARATIVOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

En el cuadro 2 se resumen las condiciones generales aplicables a los ensayos. El material y las demás condiciones experimentales relativas específicamente a un ensayo concreto se describen después bajo el título de cada ensayo.

Cuadro 2: Condiciones de los ensayos

Ensayo	Perdida de DOC	Desprendimiento de CO_2	Respiración manometrica	Detección de la OCDE modificada	Frasco cerrado	MITI-(I)
Concentración de sustancia problema mg/l mg COD/l mg DTO/l	10-40	10-20	100 50-100	10-40	2-10 5-10	100
Concentración de inóculo (en células/l, aproximadamente)	≤ 30 mg/l SS o ≤ 100 ml efluente/l ($10^7 - 10^8$)			0,5 ml efluente secundario/l (10^5)	≤ 5 ml efluente/l ($10^4 - 10^6$)	30 mg/l SS ($10^7 - 10^8$)
Concentración de elementos en el medio mineral (en mg/l): P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferentemente 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

COD = Carbono orgánico disuelto DTO = Demanda teórica de oxígeno SS = Sólidos en suspensión

1.6.1. **Agua de dilución**

Se usará agua desionizada o destilada, exenta de sustancias tóxicas (por ejemplo, iones Cu^{++}) a concentraciones inhibidoras. No debe contener más del 10 % del contenido en carbono orgánico introducido por la sustancia problema. Esta elevada pureza del agua es necesaria para no obtener valores elevados en la prueba en blanco. La contaminación puede proceder de impurezas inherentes, y también, de las resinas cambiadoras de iones y de residuos materiales procedentes de bacterias y algas. Para cada serie de ensayos debe utilizarse un solo lote de agua, comprobado previamente mediante análisis de COD. Esta comprobación no es necesaria para el ensayo del frasco cerrado, pero el consumo de oxígeno del agua debe ser bajo.

1.6.2. **Soluciones madre de elementos minerales**

Las soluciones de ensayo se prepararán a partir de soluciones madre de elementos minerales en concentración adecuada. Las siguientes soluciones madre pueden utilizarse (con diferentes factores de dilución) en los métodos de pérdida de COD, detección de la OCDE modificada, desprendimiento de CO_2, respirometría manometrica y frasco cerrado.

Los factores de dilución y, en el caso de la prueba MITI, la preparacion especifica del medio mineral se recogen bajo el encabezamiento de cada prueba especifica.

Soluciones madre:

Hay que preparar las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de grado analítico.

(a) Ortofosfato diácido de potasio, KH_2PO_4 — 8,50 g
Ortofosfato ácido de potasio, K_2HPO_4 — 21,75 g
Ortofosfato ácido de sodio dihidratado $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ — 33,40 g
Cloruro amónico, NH_4CL — 0,50 g
Disolver en agua y enrasar a 1 litro. El pH de la solucion debe ser 7,4.

(b) Cloruro cálcico, anhidro, $CaCl_2$ — 27,50 g
o Cloruro cálcico dihidratado, $CaCl_2 . 2 H_2O$ — 36,40 g
Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

(c) Sulfato magnésico heptahidratado, $MgSO_4 . 7 H_2O$ — 22,50 g
Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

(d) Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3 . 6 H_2O$ — 0,25 g
Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

Nota: con el fin de no tener que preparar esta solución inmediatamente antes de su uso, añádase una gota de HCl concentrado o 0,4 g de EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético) por litro.

1.6.3. **Soluciones madre de productos químicos**

Por ejemplo, disolver de 1 a 10 g, según se considere adecuado, de sustancia problema o de referencia en agua desionizada y enrasar a 1 litro cuando la solubilidad sea superior a 1 g/l. En caso contrario, preparar soluciones madre en el medio mineral o añadir los productos químicos directamente en el medio mineral. Para el tratamiento de productos químicos menos solubles, véase el Anexo III, pero teniendo en cuenta que en la prueba del MITI (Método C.4-F) no pueden utilizarse ni disolventes ni emulgentes.

1.6.4. **Inóculos**

El inóculo puede proceder de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes (no cloradas), aguas superficiales, suelos o una mezcla de todo ello. En el caso de los ensayos de pérdida de COD, desprendimiento del CO_2 y respirometría manometrica, si se utiliza lodo activado, éste debe proceder de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Se ha visto que los inóculos procedentes de otras fuentes dan resultados más dispersos. En el caso de la prueba de detección de la OCDE modificada y de la prueba de frasco cerrado, es necesario un inóculo más diluido sin flóculos de lodo

y la fuente preferida es un efluente secundario procedente de una depuradora de aguas residuales domésticas o de una instalación de laboratorio. En el caso del método MITI, el inóculo se obtiene mezclando material procedente de distintas fuentes y se describe bajo el encabezamiento específico de esta prueba.

I.6.4.1. *Inóculo procedente de lodos activados*

Se recoge una muestra de lodo activado recién obtenido del depósito de aireación de una planta depuradora de aguas residuales o de una instalación de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas. En caso necesario, se retiran las partículas gruesas, por filtración a través de un tamiz fino y a continuación se mantiene el lodo en condiciones aerobias.

Otra posibilidad es dejar sedimentar o centrifugar (por ejemplo, a 1 100 g durante 10 minutos) después de eliminar las posibles partículas gruesas. Se desecha el sobrenadante. El lodo puede ser lavado en el medio mineral. Se suspende el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/l y se somete a aireación hasta que se utilice.

El lodo debería obtenerse de una planta convencional que trabaje adecuadamente. Si tiene que obtenerse el lodo de una planta depuradora de elevado rendimiento o cuando se piense que contiene inhibidores, debería lavarse el lodo. El lodo resuspendido se mezcla bien y se deja sedimentar o se centrifuga, se desecha el sobrenadante del lodo lavado y se vuelve a resuspender en otro volumen de medio mineral. Este procedimiento se repite hasta que se considere que el lodo queda exento de un exceso de sustrato o de inhibidores.

Después de conseguir la resuspensión completa, o con el lodo sin tratar, se toma una muestra justo antes de su utilización para determinar el peso seco de los sólidos en suspensión.

Otra posibilidad diferente es homogeneizar el lodo activado (de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/l). Se trata el lodo en un agitador mecánico durante 2 minutos a velocidad media. El lodo agitado se deja sedimentar durante 30 minutos, o más en caso necesario, y se decanta el líquido para utilizarlo como inóculo en la proporción de 10 ml/l de medio mineral.

I.6.4.2. *Otras fuentes de inóculos*

Este inóculo puede obtenerse a partir del efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Se toma una muestra reciente y se mantiene en condiciones aerobias durante el transporte. Se deja sedimentar durante 1 hora o se filtra a través de papel de filtro grueso y el efluente decantado o el filtrado se mantiene en condiciones aerobias hasta su utilización. Pueden utilizarse hasta 100 ml de este tipo de inóculo por cada litro de medio.

Otra fuente adicional de inóculo es el agua superficial. En este caso, se recoge una muestra de un agua superficial adecuada como, por ejemplo, ríos o lagos, y se mantiene en condiciones aerobias hasta su utilización. En caso necesario, se concentra el inóculo por filtración o centrifugación.

I.6.5. **Acondicionamiento previo de los inóculos**

Los inóculos pueden estar preacondicionados a las condiciones experimentales, pero no preadaptados a la sustancia problema. El acondicionamiento previo consiste en la aireación del lodo activado en medio mineral o bien del efluente secundario durante 5 o 7 días a la temperatura del ensayo. El acondicionamiento previo mejora a veces la precisión de los métodos de ensayo reduciendo los valores del blanco. El acondicionamiento previo se considera innecesario para el inóculo del MITI.

I.6.6. **Controles abióticos**

Cuando sea necesario, se estudiará la posible degradación abiótica de la sustancia problema determinando la eliminación de COD, el consumo de oxígeno o el desprendimiento de dióxido de carbono en controles estériles que no contengan inóculo. La esterilización se consigue mediante filtración a través de membrana (0,2-0,45 micrómetros) o mediante la adición de una sustancia tóxica adecuada a la concentración conveniente. Si se utiliza una membrana de filtración, coger las muestras de forma aséptica para mantener la esterilidad. A no ser que la absorción de la sustancia problema haya sido excluida de antemano, las pruebas en las que se mide la biodegradación como la eliminación de COD, especialmente con lodo activado como inóculo, debieran incluir un control abiótico inoculado y envenenado.

I.6.7. **Número de frascos**

El número de frascos en un ensayo normal se describe bajo el encabezamiento de cada ensayo.

Pueden utilizarse los siguientes tipos de frasco:

Suspensión de ensayo:	conteniendo la sustancia problema y el inóculo.
Inóculo aislado:	conteniendo únicamente inóculo.
Control del procedimiento:	conteniendo sustancia problema e inóculo.
Control estéril abiótico:	estéril, conteniendo la sustancia problema (véase punto I.6.6.).
Control de absorción:	conteniendo la sustancia problema, inóculo y agente esterilizante.
Control de toxicidad:	conteniendo la sustancia problema, la sustancia de referencia e inóculo.

La determinación en la suspensión de ensayo y en el inóculo aislado deberían realizarse obligatoriamente en paralelo. Es aconsejable realizar las determinaciones en los otros frascos también en paralelo.

Sin embargo, esto puede no ser siempre posible. Hay que asegurarse de que se toman bastantes muestras o lecturas para tener la certeza de que se alcanza el porcentaje de eliminación adecuado durante el periodo de tiempo de 10 días.

I.7 DATOS Y EVALUACIÓN

Para el cálculo de D_t, degradación porcentual, se utilizan los valores medios de las medidas de los parámetros, realizadas por duplicado en los dos recipientes del ensayo y en el blanco. Las fórmulas vienen dadas en las secciones específicas correspondientes a cada ensayo. El curso de la degradación se representa gráficamente y se indica el período de observación de 10 días. Se calcula y se registra la pérdida porcentual al final del período de observación de 10 días y el valor en la fase estacionaria o al final del ensayo, según se considere adecuado.

En los ensayos respirométricos, los compuestos nitrogenados pueden afectar al consumo de oxígeno debido a la nitrificación (véanse los Anexos II y V).

I.7.1. **Medida de la degradación basada en la determinación del COD**

El porcentaje de degradación (D_t) en cada momento en que se tome una muestra debiera calcularse separadamente para los frascos conteniendo la sustancia problema, utilizando los valores medios de las medidas por duplicado del COD con el fin de valorar la validez de la prueba (véase punto I.5.2). Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

donde:

D_t = degradación porcentual en el tiempo t.

C_o = concentración media inicial de COD en el medio de cultivo inoculado con la sustancia problema (mg COD/l),

C_t = concentración media de COD en el medio de cultivo inoculado con sustancia problema en el tiempo t (mg COD/l),

C_{bo} = concentración media inicial de COD en el medio mineral en blanco inoculado (mg COD/l),

C_{bt} = concentración media de COD en el medio mineral en blanco inoculado, en el tiempo t (mg COD/l).

Todas las concentraciones son las obtenidas experimentalmente.

I.7.2. **Degradación medida por análisis específicos**

Cuando se tienen datos analíticos específicos, la biodegradación primaria se calcula con la fórmula siguiente:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

donde:

D_t = degradación porcentual en el tiempo t, normalmente 28 días,

S_a = cantidad residual de sustancia problema en el medio inoculado al final de la prueba (mg),

S_b = cantidad residual de sustancia problema en la prueba en blanco con agua o medio a los que sólo se ha aADnadido la sustancia problema (mg).

I.7.3. **Degradación abiótica**

Cuando se utilice un control abiótico estéril, calcular el porcentaje de degradación abiótica utilizando:

$$\text{\% de degradación abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

donde

$C_{s(o)}$ = concentración COD en el control estéril el día 0,

$C_{s(t)}$ = concentración COD en el control estéril el día t.

I.8. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— sustancias problema y de referencia así como su pureza;

— condiciones del ensayo;

— inóculo: naturaleza y lugar o lugares de recogida, concentración y posible tratamiento de acondicionamiento previo;

— proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se conocen;

— tiempo de duración del ensayo y temperatura a la que se ha realizado;

— en caso de sustancias problema poco solubles, tratamiento realizado;

— método de ensayo utilizado; motivos científicos y explicación en caso de que se haya realizado algún cambio en el procedimiento;

— ficha de recogida de datos;

— cualquier fenómeno de inhibición que se haya observado;

— cualquier degradación abiótica que se haya observado;

— datos químicos analíticos específicos, si se tienen;

— datos analíticos sobre los intermediarios, si se tienen;

— gráfica de la degradación porcentual frente al tiempo para las sustancias problema y de referencia; hay que indicar claramente la fase de latencia, la fase de degradación, el período de observación de 10 días y la pendiente (Anexo I). Si la prueba ha cumplido con los criterios de validez, podrá utilizarse para la gráfica la media de los porcentajes de degradación de los frascos que contengan la sustancia problema;

— porcentaje de eliminación obtenido después del período de observación de 10 días, en la fase estacionaria y al final de la prueba.

PARTE II. ENSAYO BASADO EN LA PÉRDIDA DE COD (Método C.4-A)

II.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Un volumen medido de medio mineral inoculado con una concentración conocida de la sustancia problema (10-40 mg COD/l) como única fuente nominal de carbono orgánico se somete a aireación en la oscuridad o bajo luz difusa a 22 ± 2 °C.

La degradación se va siguiendo mediante el análisis del COD a intervalos frecuentes durante un período de 28 días. El grado de biodegradación se calcula expresando la concentración de COD eliminada (corregida con los valores obtenidos en el blanco con inóculo) como porcentaje de la concentración presente inicialmente. El grado de biodegradación primaria también puede calcularse mediante análisis químico complementario realizado al principio y al final de la incubación.

II.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

II.2.1. **Equipo**

(a) Matraces cónicos, por ejemplo de 250 ml hasta 2 l, según el volumen necesario para los análisis de COD;

(b) Agitador para matraces cónicos, bien con control automático de la temperatura o bien situado en una sala a temperatura constante. La agitación debe ser suficiente como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces;

(c) Equipo de filtración con membranas adecuadas;

(d) Analizador de COD;

(e) Equipo para determinar el oxígeno disuelto;

(f) Centrífuga.

II.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase I.6.2.

Se mezclan 10 ml de solución (a) con 800 ml de agua de dilución, se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 l con agua de dilución.

II.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. y I.6.5.

II.2.4. **Preparación de los matraces**

Como ejemplo, se introducen alícuotas de 800 ml de medio mineral en matraces cónicos de 2 litros y se añaden volúmenes suficientes de las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia a los distintos matraces para obtener una concentración de sustancia equivalente a 10-40 mg COD/l. Controlar los valores del pH y ajustar a 7,4 si es necesario. Se inoculan los matraces con lodo activado u otra fuente de inóculo (véase el punto I.6.4.), para obtener una concentración final que no exceda de 30 mg de sólidos en suspensión/l. También hay que preparar controles del inóculo en el medio mineral pero sin sustancia problema ni de referencia.

En caso necesario, puede utilizarse un recipiente para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema inoculando una solución que contenga, en el medio mineral, concentraciones comparables tanto de la sustancia problema como de la sustancia de referencia.

También, en caso necesario, puede prepararse otro matraz estéril para observar si la sustancia problema se degrada abióticamente. Para ello, se utiliza una solución de la sustancia problema sin inóculo (véase el punto I.6.6.).

Además, si se sospecha que la sustancia problema puede adsorberse de forma significativa en las paredes o fondo del recipiente utilizado para la realización del ensayo, en los lodos, etc., hay que hacer una evaluación previa para determinar la importancia de la adsorción y, en consecuencia, la idoneidad de la prueba para esa sustancia (véase el cuadro 1). Preparar un matraz conteniendo la sustancia problema, el inóculo y el agente esterilizante.

Todos los matraces se enrasan a 1 l con medio mineral y, tras mezclar, se toma una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD (véase el Anexo II.4). Por ejemplo, se tapa la boca de los matraces con papel de aluminio, de forma que se permita la libre circulación de aire entre el matraz y la atmósfera ambiente. A continuación se ponen los recipientes en el agitador para iniciar el ensayo.

II.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

matraz 5: control de procedimiento

preferentemente y cuando sea necesario:

matraz 6: control estéril abiótico

matraz 7: control de adsorción

matraz 8: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

II.2.6. **Realización del ensayo**

A lo largo de todo el ensayo, hay que determinar la concentración de COD en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos con la suficiente frecuencia para poder determinar el principio del periodo de observación de 10 días y la pérdida porcentual al final de dicho periodo de 10 días. Debe limitarse al mínimo el volumen de suspensión problema tomado para cada determinación.

Antes de tomar las muestras, hay que compensar las pérdidas por evaporación de los matraces añadiendo agua de dilución (I.6.1) en la cantidad necesaria. Antes de tomar las muestras hay que homogeneizar bien el medio de cultivo y asegurarse de que el material que se adhiere a las paredes de los recipientes se disuelve o resuspende. Inmediatamente después de tomar la muestra, ésta se filtra por membrana o se centrifuga (véase el Anexo II.4). La muestra filtrada o centrifugada se analiza el mismo día; en caso contrario, se conserva a 2-4 °C durante un máximo de 48 horas, o por debajo de − 18 °C durante un periodo mayor.

II.3. DATOS E INFORME

II.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Calcular la degradación porcentual al tiempo t según se indica en el punto I.7.1. (determinación de COD) y, de forma optativa, en el punto I.7.2. (análisis específico).

Todos los resultados deben registrarse en las fichas de recogida de datos presentadas.

II.3.2. **Validez de los resultados.**

Véase el punto I.5.2.

II.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

II.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de la ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE PÉRDIDA DE COD

1. LABORATORIO

2. FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA

3. SUSTANCIA A EXAMINAR

Nombre: . . .

Concentr..ción de la solución madre: ... mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio, t_0: ... mg/l en sustancia química

4. INÓCULO

Fuente: . . .

Tratamiento realizado: . . .

Acondicionamiento previo en su caso: . . .

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de ensayo: . . . mg/l

5. DETERMINACIONES DE CARBONO

Analizador de carbono:

	Matraz nº		COD tras n días (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_n
Sustancia problema más inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Ensayo en blanco con inóculo pero sin sustancia problema	3	c_1					
		c_2					
		c, media $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Matraz nº		% de degradación tras n días				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Si existe una diferencia considerable entre D_1 y D_2, no debe calcularse el término medio.

Nota: pueden utilizarse fórmulas similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. CONTROL ABIÓTICO (optativo)

	Tiempo (días)	
	0	t
conc. de COD (mg/l) en el control estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de degradación abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO (optativo)

	Cantidad residual de la sustancia química al final de la prueba (mg/l)	% degradación
Control estéril	S_b	
Prueba con el medio inoculado	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE III. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OCDE MODIFICADO (Método C.4-B)

III.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Un volumen medido de medio mineral con una concentración conocida de la sustancia problema (10-40 mg COD/l) como única fuente nominal de carbono orgánico se inocula con 0,5 ml de efluente por litro de medio. La mezcla se airea en la oscuridad o bajo luz difusa a 22 ± 2 °C.

La degradación se va siguiendo mediante análisis del COD a intervalos frecuentes a lo largo de un periodo de 28 días. El grado de biodegradación se calcula expresando la concentración de COD eliminado (corregida con los valores obtenidos en el blanco con inóculo) como porcentaje de la concentración presente inicialmente. El grado de biodegradación primaria también puede calcularse a partir de análisis químicos suplementarios realizados al principio y al final de la incubación.

III.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

III.2.1. Equipo

(a) Matraces cónicos, por ejemplo de 250 ml a 2 l, según el volumen necesario para el análisis de COD;

(b) Agitador para matraces cónicos, bien con control automático de temperatura o bien situado en una sala de temperatura constante. La agitación debe ser suficiente como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces;

(c) Equipo de filtración con membranas adecuadas;

(d) Analizador de COD;

(e) Equipo para determinar el oxígeno disuelto;

(f) Centrífuga.

III.2.2. Preparación del medio mineral

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de la solución (a) con 800 ml de agua de dilución, se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 l con agua de dilución.

Este método utiliza tan sólo 0,5 ml de efluente/l como inóculo y, por tanto, puede ser necesario enriquecer el medio con oligoelementos y factores de crecimiento. Esto se consigue añadiendo 1 ml de cada una de las siguientes soluciones por litro de medio final:

Solución de oligoelementos:

Sulfato de manganeso tetrahidratado, $MnSO_4 \cdot 4H_2$	39,9 mg
Acido bórico, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfato de zinc heptahidratado, $ZnSO_4 \cdot 7H_2$	42,8 mg
Heptamolibdato de amonio $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Quelato de hierro ($FeCl_3$ ácido etilendiaminotetraacético)	100,0 mg

Disolver en agua de dilución y llevar a 1 000 ml.

Solución de vitaminas:

Extracto de levadura	15,0 mg

Disolver el extracto de levadura en 100 ml de agua. Esterilizar mediante filtración por membrana de 0,2 micrómetros o bien preparar extemporáneamente.

III.2.3. Preparación y acondicionamiento previo del inóculo

El inóculo está derivado de un efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba de manera primordial aguas residuales domésticas. Véanse los puntos I.6.4.2. y I.6.5.

Se usan 0,5 ml por litro de medio mineral.

III.2.4. Preparación de los matraces

Se introducen porciones de, por ejemplo, 800 ml de medio mineral en matraces cónicos de 2 litros y se añaden volúmenes suficientes de las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia a los distintos matraces para obtener una concentración de sustancia equivalente a 10-40 mg COD/l. Revise el valor pH y ajústelo si es necesario, a 7,4. Se inoculan los matraces con efluente de aguas residuales en la proporción de 0,5 ml/l (véase I.6.4.2.). También deben prepararse controles del inóculo con el medio mineral pero sin sustancia problema ni de referencia.

En caso necesario, puede utilizarse un matraz para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema inoculando una solución que contenga, en medio mineral, concentraciones comparables tanto de la sustancia problema como de una sustancia de referencia.

También, en caso necesario, puede prepararse otro matraz estéril para comprobar si la sustancia problema se degrada abióticamente utilizando una solución de esta sustancia sin inóculo (véase I.6.6.).

Además, si se sospecha que la sustancia problema puede adsorberse de forma significativa en el recipiente utilizado para el ensayo, en los lodos, etc., debe hacerse una prueba previa para determinar el alcance probable de la absorción y, en consecuencia, la adecuación de la prueba para esa sustancia concreta (véase el cuadro 1). Prepárese un matraz conteniendo la sustancia problema, el inóculo y un agente esterilizante.

Todos los matraces se enrasan a 1 l con medio mineral y, después de agitar, se toma una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD (véase el Anexo II.4). Se tapan las bocas de los matraces con papel de aluminio, por ejemplo, de forma que se permita la libre circulación de aire entre el matraz y la atmósfera circundante. A continuación se ponen los recipientes en el agitador para iniciar el ensayo.

III.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

matraz 5: control de procedimiento

preferentemente y cuando sea necesario:

matraz 6: control estéril abiótico

matraz 7: control de adsorción

matraz 8: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

III.2.6. **Realización del ensayo**

A lo largo del ensayo hay que determinar las concentraciones de COD en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos, con la suficiente frecuencia como para poder determinar el inicio del período de observación de 10 días y el porcentaje de eliminación al final de dicho período de 10 días. Para cada determinación debe tomarse sólo el volumen mínimo necesario de suspensión problema.

Antes de tomar las muestras, hay que compensar las pérdidas que se han producido por evaporación del medio de ensayo en los matraces, añadiendo la cantidad necesaria de agua de dilución (I.6.1). Antes de tomar las muestras hay que agitar bien el medio de cultivo y asegurarse de que el material que se hubiera adherido a las paredes de los recipientes se disuelve o se resuspende. Se filtra por membrana o se centrifuga (véase el Anexo II.4) inmediatamente después de haber tomado la muestra. Las muestras filtradas o centrifugadas se analizan el mismo día; en caso contrario, se conservan a 2-4 °C durante 48 horas como máximo o por debajo de − 18 °C durante un período más prolongado.

III.3. DATOS E INFORME

III.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se calcula el porcentaje de degradación en el tiempo t según se indica en I.7.1. (determinación de COD) y, de forma optativa, en I.7.2. (análisis específico).

Todos los resultados deben registrarse en las fichas de recogida de datos indicadas.

III.3.2. **Validez de los resultados**

Véase el punto I.5.2.

III.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

III.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se ofrece un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OECD MODIFICADO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:

Concentración de la solución madre: mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio, t_0: mg/l ensustancia química

4. **INÓCULO**

Fuente:

Tratamiento realizado:

Acondicionamiento previo en su caso:

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: mg/l

5. **DETERMINACIONES DE CARBONO**

Analizador de carbono:

	Matraz nº		COD tras n días (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_n
Sustancia problema más inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Blanco con inóculo pero sin sustancia problema	3	c_1					
		c_2					
		c, media $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Matraz		% de degradación transcurridas				
		0	n_1	n_2	n_3	n_n
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Si existe una diferencia considerable entre D_1 y D_2, no debe calcularse el término medio.

Nota: pueden utilizarse fórmulas similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. CONTROL ABIOTICO (optativo)

	Tiempo (días)	
	0	t
conc. de COD (mg/l) en el control estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{\% de degradación abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALISIS QUIMICO ESPECIFICO (optativo)

	Cantidad residual de la sustancia química al final de la prueba	% degradación primaria
Control estéril	S_b	
Prueba con el medio inoculado	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE IV. ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE CO_2 (Método C.4-C)

IV.1. PRINCIPIO DEL METODO

Se hace pasar una corriente de aire exento de dióxido de carbono a velocidad controlada, en la oscuridad o bajo luz difusa, a través de un volumen medido de medio mineral inoculado que contiene una concentración conocida de la sustancia problema (10-20 mg COD o COT/l) como única fuente nominal de carbono orgánico. La degradación se observa a lo largo de 28 días determinando el dióxido de carbono producido, que se recoge en hidróxido de sodio o de bario y se mide por valoración del hidróxido residual o como carbono inorgánico. La cantidad de dióxido de carbono producido a partir de la sustancia problema (con las correcciones necesarias según el resultado del blanco con inóculo) se expresa como porcentaje de CO_2T. El grado de biodegradación también puede calcularse mediante un análisis complementario de COD realizado al principio y al final de la incubación.

IV.2. DESCRIPCION DEL METODO

IV.2.1. Equipo

(a) Matraces, 2-5 litros, provisto cada uno de un tubo de aireación, que llegue practicamente al fondo del recipiente, y de una salida;

(b) Agitadores magnéticos, cuando se trate de sustancias poco solubles;

(c) Frascos de absorción de gases;

(d) Aparato para controlar y medir el flujo de aire;

(e) Aparato para eliminar el dióxido de carbono en la preparación de aire exento de dióxido de carbono; otra posibilidad es utilizar una mezcla de oxigeno exento de CO_2 y de nitrógeno exento de CO_2, provenientes de sendas botellas, en las proporciones correctas (20 % O_2:80 % N_2);

(f) Equipo para determinar el dióxido de carbono, bien volumétricamente o bien con un analizador de carbono inorgánico;

(g) Equipo de filtración por membrana (opcional);

(h) Analizador de COD (opcional).

IV.2.2. Preparación del medio mineral

Para la preparación de las soluciones madre, véase I.6.2.

Se mezclan 10 ml de solución (a) con 800 ml de agua de dilución; se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 l con agua de dilución.

IV.2.3. Preparación y acondicionamiento previo del inóculo

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. y I.6.5.

IV.2.4. Preparación de los matraces

Los siguientes volúmenes y pesos, dados meramente como ejemplo, indican los valores apropiados para matraces de 5 litros que contengan 3 l de suspensión. Si se utilizan volúmenes más pequeños hay que modificar los valores en consecuencia, pero hay que asegurarse de que el dióxido de carbono formado puede medirse con precisión.

A cada matraz de 5 litros se añaden 2 400 ml de medio mineral. Se añade a continuación un volumen adecuado del lodo activado ya preparado (véanse los puntos I.6.4.1 y I.6.5.) para tener una concentración de sólidos en suspensión que no exceda de 30 mg/l en el volumen final de 3 l de mezcla inoculada. Otra posibilidad es diluir en primer lugar el lodo preparado para obtener una suspensión de 500-1 000 mg/l en el medio mineral antes de

añadir una alícuota al contenido del matraz de 5 litros para obtener una concentración final de 30 mg/l; de esta forma se consigue mayor precisión. También pueden utilizarse otras fuentes de inóculos (véase el punto I.6.4.2.). añadir una alícuota al contenido del matraz de 5 litros para obtener una concentración final de 30 mg/l; de esta forma se consigue mayor precisión. También pueden utilizarse otras fuentes de inóculos (véase el punto I.6.4.2.).

Estas mezclas inoculadas se someten a un flujo de aire exento de CO_2 durante una noche para purgar el dióxido de carbono del sistema.

Se añade a los matraces, por separado y por duplicado, la sustancia problema y la sustancia de referencia procedentes de sendas soluciones madre, en volúmenes conocidos, como para obtener concentraciones de 10 a 20 mg de COD o COT/l, procedente de las sustancias añadidas; algunos matraces se dejan como controles del inóculo sin añadirles ninguna sustancia. Las sustancias problema poco solubles se añaden directamente a los matraces teniendo en cuenta una relación de peso o de volumen, o bien se opera según se describe en el Anexo III.

En caso necesario, puede utilizarse un matraz para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema añadiendo tanto sustancia problema como sustancia de referencia en las mismas concentraciones que se dan en los otros matraces.

También, en caso necesario, puede utilizarse un matraz estéril para comprobar si la sustancia problema se degrada abióticamente utilizando una solución de la sustancia sin inóculo (véase I.6.6.). Esterilícese mediante la adición de una sustancia tóxica en la concentración apropiada.

Se llevan los volúmenes de las suspensiones de todos los matraces a 3 l mediante adición de medio mineral previamente aireado con aire exento de CO_2. Otra posibilidad es tomar muestras para el análisis del COD (véase el Anexo II.4.) o análisis específicos. Se conectan los frascos de absorción a las salidas de aire de los matraces.

Si se utiliza hidróxido de bario, hay que conectar a cada matraz de 5 litros tres frascos de absorción puestos en serie, cada uno con 100 ml de solución de hidróxido de bario 0,0125 M. La solución debe estar exenta de sulfatos y carbonatos precipitados y su concentración debe determinarse justo antes de ser utilizada. Si se utiliza hidróxido de sodio, se conectan dos frascos, de los que el segundo actúa como control para comprobar que todo el dióxido de carbono ha quedado absorbido en el primero. Son adecuados los frascos de absorción provistos de cierres de botellas de suero. A cada frasco se añaden 200 ml de solución de hidróxido de sodio 0,05 M, cantidad suficiente para absorber todo el dióxido de carbono producido si la sustancia química se degrada por completo. La solución de hidróxido de sodio, incluso cuando se prepara extemporáneamente, contiene [illegible] de carbonatos; esto se corrige deduciendo la cantidad de carbonatos presentes en el blanco.

IV.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

matraz 5: control de procedimiento

preferentemente y cuando sea necesario:

matraz 6: control estéril abiótico

matraz 7: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

IV.2.6. **Realización del ensayo**

El ensayo se inicia haciendo borbotear aire exento de CO_2 a través de las suspensiones a la velocidad de 30-100 ml/min. Periódicamente se toman muestras del absorbente de dióxido de carbono para analizar el contenido de CO_2. Durante los primeros 10 días se recomienda que los análisis se hagan cada dos o tres días y, después, cada cinco días hasta llegar al día 28, de forma que pueda determinarse el período de observación de 10 días.

El día 28 se toman muestras (opcionalmente) para el análisis de COD o análisis específicos, se mide el pH de las suspensiones y se añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado a cada matraz; se airean los frascos durante una noche para arrastrar el dióxido de carbono presente en las suspensiones problema. El día 29 se hace el último análisis del dióxido de carbono producido.

Los días en que se haga la medición del CO_2, se desconecta el absorbente de hidróxido de bario más próximo al matraz y se valora la solución de hidróxido con HCl 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. Los restantes absorbentes se unen al matraz y se coloca en el extremo libre de la serie un nuevo absorbente con 100 ml de hidróxido de bario 0,0125 M recién preparado. Hay que hacer valoraciones según sea necesario, por ejemplo, cuando se observe la aparición de un precipitado importante en el primer frasco y antes de que aparezca en el segundo, o al menos una vez por semana. Cuando se utiliza NaOH como absorbente, se toma con jeringa una muestra pequeña (según las características del analizador de carbono utilizado) de la solución de hidróxido de sodio del absorbente más próximo al matraz. Se inyecta la muestra en la parte CI del analizador de carbono para analizar directamente el dióxido de carbono producido.

El contenido del segundo frasco sólo se analiza al final de la prueba para introducir las correcciones necesarias en caso de que se haya producido arrastre de dióxido de carbono.

IV.3. DATOS E INFORME

IV.3.1. **Tratamiento de los resultados**

La cantidad de CO_2 retenida en un absorbente viene dada por:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

donde:

V = volumen de HCl utilizado para valorar los 100 ml del absorbente (ml),

C_B = concentración de la solución de hidróxido de bario (M),

C_A = concentración de la solución de ácido clorhídrico (M).

Si C_B es 0,0125 M y C_A es 0,05 M, el resultado de la valoración de 100 ml de hidróxido de bario es 50 ml y el peso de CO_2 viene dado por:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl valorado} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Así pues, para pasar el volumen de HCl valorado a mg de CO_2 producido, el factor en este caso es 1,1.

Se calculan los pesos de CO_2 producido del inóculo solo y del inóculo más la sustancia problema utilizando los respectivos resultados de valoración y la diferencia es el peso de CO_2 producido a partir de la sustancia problema sola.

Por ejemplo, si el inóculo solo da una valoración de 48 ml y el inóculo con la sustancia problema da 45 ml,

CO_2 del inóculo = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

CO_2 del inóculo con la sustancia problema = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

y, por tanto, el peso de CO_2 producido a partir de la sustancia problema es 3,3 mg.

El porcentaje de biodegradación se calcula con la fórmula siguiente:

$$\%\ \text{degradación} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ producido} \times 100}{CO_2T \times \text{mg de sustancia problema añadida}}$$

o bien

$$\%\ \text{degradación} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ producido} \times 100}{\text{mg COT añadido en la prueba} \times 3{,}67}$$

3,67 es el factor de conversión (44/12) para pasar de carbono a dióxido de carbono.

El porcentaje de degradación tras un intervalo cualquiera de tiempo se obtiene sumando los valores porcentuales de CO_2T calculados para cada uno de los días hasta el momento en que se haya medido.

En el caso de absorbentes de hidróxido de sodio, la cantidad de dióxido de carbono producido, expresado como CI (mg) se calcula multiplicando la concentración de CI en el absorbente por el volumen de éste.

El porcentaje de degradación se calcula con la fórmula siguiente:

$$\% \ CO_2T = \frac{\text{mg CI del matraz problema} - \text{mg CI del blanco}}{\text{mg COT añadidos como sustancia problema}} \times 100$$

La pérdida de COD se calcula opcionalmente según se describe en 1.7. Se registran estos resultados y todos los demás en las fichas de datos mencionadas.

IV.3.2. Validez de los resultados

El contenido en CI de la suspensión de sustancia problema en el medio mineral al inicio de la prueba debe ser inferior al 5 % del CT, y el desprendimiento total de CO_2 en el blanco con inóculo al final de la prueba no debe exceder normalmente de 40 mg/l por término medio. Si se obtienen valores superiores a 70 mg CO_2/l, es necesario revisar críticamente los datos y la técnica experimental.

Véase también el punto 1.5.2.

IV.3.3. Informe

Véase el punto 1.8.

IV.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se presenta un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE DIOXIDO DE CARBONO

1. LABORATORIO

2. FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA

3. SUSTANCIA A EXAMINAR

Nombre: . . .

Concentración de la solución madre: . . . mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio: . . . mg/l en sustancia química

Carbono total añadido al matraz: . . . mg C

CO_2T: . . . mg CO_2

4. INOCULO

Fuente: . . .

Tratamiento realizado: . . .

Acondicionamiento previo en su caso: . . .

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: . . . mg/l

5. PRODUCCION DE DIOXIDO DE CARBONO Y DEGRADABILIDAD:

Método: $Ba(OH)_2$/NaOH/otro

Tiempo (día)	CO_2 formado (mg)		CO_2 formado blanco (mg)		CO_2 formado acumulado (mg) (ensayo menos blanco)		% CO_2 $\frac{CO_2 \text{ acumulado}}{CO_2T} \times 100$		
	1 / 2	media	3 / 4	media	1	2	1	2	media
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: pueden utilizarse otros formatos similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad

6. ANALISIS DE CARBONO (opcional)

Analizador de carbono:

Tiempo (día)	blanco mg/l	sustancia problema mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) o al final de la incubación		

$$\% \ COD \ eliminado = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. DEGRADACIÓN ABIÓTICA (opcional)

$$\% \ degrad. \ abiót. = \frac{\text{formac. de } CO_2 \text{ en el matraz estéril tras 28 días (mg)}}{CO_2T \text{ (mg)}} \times 100$$

PARTE V. RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA (Método C.4-D)

V.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se somete a agitación en un frasco cerrado a temperatura constante (± 1 °C o más exacto), durante 28 días, un volumen medido de medio mineral inoculado que contenga una concentración conocida de la sustancia química de ensayo (100 mg/l de la sustancia de ensayo, para dar al menos 50-100 mg DTO/l) como única fuente nominal de carbono orgánico. Se determina el consumo de oxígeno midiendo la cantidad de oxígeno (producido por electrólisis) requerido para mantener un volumen constante de gas en el frasco del respirómetro, o a partir de los cambios de volumen o presión (o una combinación de ambas cosas) en el aparato. El dióxido de carbono producido se absorbe en una solución de hidróxido potásico u otro absorbente adecuado. La cantidad de oxígeno consumido por la sustancia problema (corregida según el consumo del blanco con inóculo, realizada en paralelo) se expresa como porcentaje de DTO o DQO. Opcionalmente, se puede calcular también la biodegradación primaria mediante un análisis adicional específico realizado al comienzo y al final de la incubación, y la biodegradación última mediante un análisis de COD.

V.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

V.2.1. Equipo

(a) respirómetro adecuado;

(b) control de temperatura, manteniéndolo con un margen de ± 1 °C o más exacto;

(c) conjunto de membrana y filtros (opcional);

(d) analizador de carbono (opcional);

V.2.2. Preparación del medio mineral

Para la preparación de las soluciones madre, véase I.6.2.

Mezclar 10 ml de la solución (a) con 800 ml de agua de dilución, añadir 1 ml de las soluciones (b) a (d) y enrasar hasta 1 l con agua de dilución.

V.2.3. Preparación y acondicionamiento previo del inóculo

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. y I.6.5.

V.2.4. Preparación de los frascos

Preparar soluciones de las sustancias problema y de referencia, en lotes separados, en un medio mineral equivalente a una concentración, normalmente, de 100 mg de sustancia /l (que dé al menos 50-100 mg DTO/l) utilizando soluciones madre.

Calcular la DTO sobre la base de la formación de sales de amonio salvo que se prevea nitrificación; en este caso, el cálculo debe basarse en la formación de nitratos (véase el Anexo II.2.).

Determinar los valores de pH y, si es necesario, ajustarlos a 7,4 ± 0,2.

Las sustancias débilmente solubles deben añadirse en un estadio posterior (véase más abajo).

Si hay que determinar la toxicidad de la sustancia problema, preparar posteriormente otra solución en medio mineral que contenga tanto la sustancia problema como la de referencia a las mismas concentraciones que las utilizadas para el ensayo.

Si se necesita una medida del consumo fisicoquímico de oxígeno, preparar una solución de la sustancia problema, generalmente, a una concentración de 100 mg DTO/l. Esterilizar dicha solución mediante la adición de una sustancia tóxica adecuada (véase I.6,6.).

Introducir en frascos, al menos por duplicado, el volumen necesario de soluciones de sustancias problema y de referencia. Añadir a los siguientes frascos solamente medio mineral (para controles de inóculos) y, si es necesario, la solución con mezcla de sustancia problema y de referencia y la solución estéril.

Si la sustancia problema es poco soluble, se añadirá directamente en este estadio basándose en el volumen o en el peso o actuando como se describe en el Anexo III. Añadir hidróxido de potasio con cal sodada u otro absorbente a los compartimentos de absorción de CO_2.

V.2.5. Número de frascos en un ensayo normal

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

matraz 5: control de procedimiento

preferentemente y cuando sea necesario:

matraz 6: control estéril

matraz 7: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

V.2.6. Realización del ensayo

Se deja que los recipientes alcancen la temperatura deseada y se inoculan los recipientes adecuados con lodo activado preparado u otra fuente de inóculo para obtener una concentración de sólidos suspendidos no superior a 30 mg/l. Se monta el equipo, se pone en marcha el agitador y se controla la impermeabilidad al aire, comenzando en este momento la medición del consumo de oxígeno. Generalmente no hay que hacer más que tomar las lecturas necesarias y los controles diarios para asegurarse de que se mantienen la temperatura correcta y la agitación adecuada.

Calcular el consumo de oxígeno según las lecturas tomadas a intervalos frecuentes y regulares, utilizando los métodos proporcionados por el fabricante del equipo. Al final de la incubación, normalmente 28 días, medir el pH del contenido de los frascos, especialmente si el consumo de oxígeno es inferior o superior a la DTO_{NH4} (en aquellos compuestos que contengan nitrógeno).

Si es necesario, se tomarán muestras de los frascos del respirómetro, al comienzo y al final, para analizar el COD o realizar un análisis químico específico (véase Anexo II.4). Cuando se haga la primera toma de muestras, hay que asegurarse de que se conoce el volumen de suspensión problema que queda en el frasco. Cuando la sustancia problema nitrogenada consuma oxígeno, determinar el aumento de la concentración de nitrito y nitrato en 28 días y calcular la corrección teniendo en cuenta el oxígeno consumido por nitrificación (Anexo V).

V.3. DATOS E INFORME

V.3.1. Tratamiento de los resultados

Dividir el consumo de oxígeno (mg) de la sustancia problema después de un tiempo dado (corregido según el blanco con inóculo después del mismo tiempo) entre el peso de la sustancia problema utilizada. Esto dará la DBO expresada en mg de oxígeno/mg de sustancia problema, es decir

$$DBO = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consumido por la sust. problema} - \text{mg } O_2 \text{ consumido por el blanco}}{\text{mg de sustancia problema en el frasco}}$$

$$= \text{mg de } O_2 \text{ por mg de sustancia problema}$$

calcular el porcentaje de biodegradación, bien a partir de:

$$\%\text{ de biodegradación} = \%\text{ DTO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2\text{/mg sustancia)}}{\text{DTO (mg } O_2\text{/mg sustancia)}} \times 100,$$

o bien de:

$$\%\text{ DQO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2\text{/mg sustancia)}}{\text{DQO (mg } O_2\text{/mg sustancia)}} \times 100$$

Debe señalarse que estos dos métodos no dan necesariamente el mismo valor. Es preferible usar el primero.

En el caso de sustancias a examinar que contengan nitrógeno, se utiliza la DTO (NH_4 o NO_3) adecuada según se espere o se sepa que va haber nitrificación o no (Anexo II.2). Si hay nitrificación pero no es completa, se calcula una corrección según el oxígeno consumido por nitrificación basándose en los cambios de la concentración de nitrito y nitrato (Anexo V).

Cuando se hagan determinaciones opcionales de carbono orgánico o análisis químicos específicos, calcular la degradación porcentual, tal como se describe en I.7.

Registrar todos los resultados en las fichas de datos adjuntas.

V.3.2. **Validez de los resultados**

El consumo de oxígeno del blanco con inóculo es normalmente de 20-30 mg O_2/l y no debe ser superior a 60 mg/l en 28 días. Los valores superiores a 60 mg/l exigirán un examen crítico de los datos y de las técnicas experimentales. Si el valor del pH está fuera del rango 6-8,5 y el consumo de oxígeno por la sustancia problema es inferior al 60 %, debe repetirse el ensayo con menor concentración de la sustancia problema.

Véase también I.5.2.

V.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

V.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de una ficha de recogida de datos.

RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA

1. LABORATORIO
2. FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA
3. SUSTANCIA A EXAMINAR

Nombre: ...

Concentración de la solución madre: ... mg/l

Concentración inicial en el medio, C_o: ... mg/l

Volumen en el matraz de prueba (V): ... ml

DTO de sustancia/DQO de sustancia: ... mg O_2/mg de sustancia a examinar (NH_4, NO_3)

4. INOCULO

Fuente: ...

Tratamiento realizado: ...

Acondicionamiento previo en su caso: ...

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: ... mg/l

5. CONSUMO DE OXÍGENO: BIODEGRADABILIDAD

		Tiempo (días)											
		0		7		14			21			28	
O_2 consumido (mg) sust. problema	1												
	2												
	a, media												
O_2 consumido (mg) blanco	3												
	4												
	b, media												
DBO (mg) corregida	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
DBO por mg de sustancia problema	$\frac{(a_1-b)}{C_oV}$												
	$\frac{(a_2-b)}{C_oV}$												
% degradación $\frac{DBO}{DTO} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Media *												
V = volumen de medio en los frascos del ensayo													

* Si existe una diferencia considerable entre D_1 y D_2, no debe calcularse el término medio.

N.B.: Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. CORRECCIÓN POR NITRIFICACIÓN (véase Anexo V)

Día	0	28	Diferencia
(i) Concentración de nitrato (mg N/l)			(N)
(ii) Equivalente de oxígeno (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii) Concentración de nitrito (mg N/l)			(N)
(iv) Equivalente de oxígeno (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Equivalente total de oxígeno	—	—	

7. ANÁLISIS DE CARBONO (opcional)

Analizador de carbono:

Tiempo (día)	Blanco mg/l	Sustancia problema mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)
(*) o al final de la incubación		

$$\% \text{ COD eliminado} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO (opcional)

S_b = concentración en el control fisicoquímico (estéril) a los 28 días.

S_a = concentración en el frasco inoculado a los 28 días.

$$\% \text{ biodegradación} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. DEGRADACIÓN ABIÓTICA (opcional)

a = consumo de oxígeno en frascos estériles después de 28 días, mg.

$$\text{consumo de oxígeno por mg de sustancia problema} = \frac{a}{C_o V}$$

(véanse las secciones 1 y 3)

$$\% \text{ degradación abiótica} = \frac{a \times 100}{C_o V \times DTO}$$

PARTE VI. ENSAYO DEL FRASCO CERRADO (Método C.4-E)

VI.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se prepara una solución de la sustancia problema en medio mineral, generalmente con una concentración de 2-5 mg/l. Esta solución se inocula con un número relativamente pequeño de microorganismos de una población mixta y se mantiene en frascos cerrados completamente llenos, en la oscuridad y a temperatura constante. La degradación se sigue mediante el análisis del oxígeno disuelto durante un período de 28 días. La cantidad de oxígeno consumido por la sustancia problema, corregido según el consumo de oxígeno por parte del blanco con inóculo realizado en paralelo, se expresa como porcentaje de DTO o DQO.

VI.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

VI.2.1. Equipo

a) Frascos de DBO, con tapones de cristal de, por ejemplo, 250-300 ml.

b) Baño maría o incubadora, para mantener los frascos a temperatura constante (± 1 °C o más exacto) en la oscuridad.

c) Frascos de cristal grandes (2-5 l) para la preparación de medios y para rellenar los frascos de DBO.

d) Electrodo de oxígeno y oxímetro o equipamiento y reactivos para la valoración según Winkler.

VI.2.2. Preparación del medio mineral

Para la preparación de la solución madre, véase I.6.2.

Mezclar 1 ml de las soluciones (a) a (d) y rellenar hasta 1 l con agua de dilución.

VI.2.3. Preparación del inóculo

El inóculo se deriva normalmente de un efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Otra fuente posible de inóculo es el agua superficial. Utilizar normalmente desde una gota (0,05 ml) hasta 5 ml de filtrado por litro de medio; se pueden necesitar varias pruebas para descubrir el volumen óptimo para un efluente dado. (Véanse los puntos I.6.4.2. y I.6.5.)

VI.2.4. Preparación de los frascos

Se airea intensamente el medio mineral durante 20 minutos por lo menos. Realizar cada serie de ensayos con el mismo medio mineral. Generalmente, el medio está listo para su uso después de dejarlo reposar 20 horas, a la temperatura del ensayo. Determinar la concentración de oxígeno disuelto como control; debe dar un valor de unos 9 mg/l a 20 °C. Todas las operaciones de transferencia y llenado de medio saturado de aire y sin burbujas, se harán, por ejemplo, mediante sifones.

Se preparan grupos paralelos de frascos de DBO para la determinación de sustancias problema y de referencia en series experimentales simultáneas. Reunir un número suficiente de frascos de DBO, incluyendo blancos con inóculo, para permitir hacer, al menos por duplicado, mediciones de consumo de oxígeno a los intervalos deseados, por ejemplo, a los 0, 7, 14, 21 y 28 días. Pueden ser necesarios más frascos si se quiere determinar el período de observación de 10 días.

Se añade medio mineral bien aireado a frascos grandes de manera que estén llenos aproximadamente hasta un tercio de su capacidad. A continuación se añade suficiente cantidad de las soluciones madre de las sustancias problema y de las sustancias de referencia a frascos grandes por separado de forma que la concentración final de las sustancias químicas no exceda normalmente de 10 mg/l. No se añadirá ninguna sustancia al blanco de control contenido en otro frasco grande.

La concentración de oxígeno disuelto no debe bajar por debajo de 0,5 mg/l en los frascos de DBO, para poder garantizar la no limitación de la actividad del inóculo. Esto limita la concentración de la sustancia problema a unos 2 mg/l. Sin embargo, en caso de compuestos poco degradables y de aquéllos que tienen baja DTO, puede usarse una concentración de 5-10 mg/l. En algunos casos, es aconsejable realizar series paralelas de sustancias problema a dos concentraciones diferentes, por ejemplo, 2 y 5 mg/l. Normalmente, se calculará la DTO basándose en la formación de sales de amonio pero, si se espera o se sabe que va a haber nitrificación, se calculará basándose en la formación de nitrato (DTO_{NO3}: véase Anexo II.2). No obstante, si hay nitrificación pero no es completa, se corregirá de acuerdo con los cambios en la concentración de nitrito y nitrato, determinada por análisis (véase Anexo V).

Si se va a investigar la toxicidad de la sustancia problema (en el caso, por ejemplo, de que se haya encontrado previamente un valor de biodegradabilidad bajo), será necesaria otra serie de frascos.

Se prepara otro frasco grande que contenga medio mineral aireado (alrededor de un tercio de su volumen) más la sustancia problema y la de referencia a concentraciones finales normalmente iguales a las de los otros frascos grandes.

Se inoculan las soluciones en los frascos grandes con efluente secundario (desde una gota, alrededor de 0,05 ml, hasta 5 ml/l) o con otra fuente como agua de río (véase I.6.4.2.). Finalmente se llevan las soluciones al volumen deseado con medio mineral aireado utilizando un tubo que llegue hasta el fondo del frasco para conseguir una mezcla adecuada.

VI.2.5. Número de frascos en una serie típica

En una serie típica se usan los siguientes frascos:

al menos 10 que contengan la sustancia problema y el inóculo (suspensión de ensayo),

al menos 10 que sólo contengan el inóculo (blanco con inóculo),

al menos 10 que contengan la sustancia de referencia y el inóculo (control de procedimiento),

y, cuando sea necesario, 6 frascos que contengan la sustancia problema, la sustancia de referencia y el inóculo (control de toxicidad). Sin embargo, puede necesitarse al menos el doble de frascos si se desea garantizar la posibilidad de determinar el período de observación de 10 días.

VI.2.6. **Realización del ensayo**

Se introduce inmediatamente cada solución preparada en el respectivo grupo de frascos de DBO mediante un tubo desde el cuarto inferior (no el fondo) del frasco grande apropiado, de forma que se rellenen completamente todos los frascos de DBO. Se golpea ligeramente para eliminar toda burbuja de aire. Se analizan inmediatamente los frascos para determinar el oxígeno disuelto a tiempo cero, mediante los métodos de Winkler o de electrodo. Pueden preservarse los contenidos de los frascos, para su análisis ulterior, mediante el método de Winkler añadiendo sulfato de manganeso (II) e hidróxido sódico (el primer reactivo del método Winkler); estos frascos, que contienen el oxígeno fijado como óxido hidratado de manganeso (III) (precipitado marrón), se pueden almacenar en la oscuridad y a 10-20 °C durante no más de 24 horas antes de continuar con el análisis según el método de Winkler. Se tapan los restantes frascos replicados asegurándose de que no quedan burbujas dentro de ellos y se incuban a 20 °C en la oscuridad. Cada serie debe acompañarse de una serie paralela completa para la determinación en el blanco inoculado. Retirar al menos frascos duplicados de todas las series para el análisis del oxígeno disuelto a intervalos de tiempo (al menos semanalmente) durante los 28 días de incubación.

Las muestras semanales permitirán la valoración del porcentaje de eliminación en un período de observación de 14 días, mientras que las muestras tomadas cada 3 o 4 días permitirán determinar el período de observación de 10 días, lo que requerirá aproximadamente el doble de frascos.

En el caso de las sustancias que contengan nitrógeno, deberán hacerse correcciones del consumo de oxígeno si tiene lugar cualquier tipo de nitrificación. Con este fin, se usará el método del electrodo de O_2 a fin de determinar la concentración de oxígeno disuelto y sacar una muestra del frasco de DBO para análisis de nitrito y nitrato. El oxígeno utilizado se calculará a partir del aumento de concentración de nitrito y nitrato (véase Anexo V).

VI.3. DATOS E INFORME

VI.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se calcula en primer lugar la DBO obtenida tras cada período de tiempo sustrayendo la depleción de oxígeno (mg O_2/l) del blanco con inóculo de la que presenta la sustancia problema. Se divide esta depleción corregida entre la concentración (mg/l) de la sustancia problema a fin de obtener la DBO específica en mg de oxígeno por mg de sustancia problema. Se calcula la biodegradabilidad porcentual dividiendo la DBO específica entre la DTO específica (calculada de acuerdo con el Anexo II.2) o la DQO (determinada por análisis, véase Anexo II.3); así pues:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg de consumo de } O_2 \text{ sustancia problema} - \text{mg de } O_2 \text{ consumo blanco}}{\text{mg sustancia problema en el frasco}}$$

$$= \text{mg de } O_2 \text{ por mg de sustancia problema}$$

$$\%\ \text{de degradación} = \frac{\text{DBO (mg } O_2\text{/mg sustancia problema)}}{\text{DTO (mg } O_2\text{/mg sustancia problema)}} \times 100$$

$$\%\ \text{de degradación} = \frac{\text{DBO (mg } O_2\text{/mg sutancia problema)}}{\text{DQO (mg } O_2\text{/mg sustancia problema)}} \times 100$$

En el caso de sustancias que contengan nitrógeno, se utiliza la DTO (NH_4 o NO_3) adecuada según se espere o se sepa que va haber nitrificación o no (Anexo II.2). Si hay nitrificación pero no es completa, se calcula una corrección según el oxígeno consumido por nitrificación basándose en los cambios de la concentración de nitrito y nitrato (Anexo V).

VI.3.2. **Validez de los resultados**

La depleción de oxígeno en el blanco con inóculo no debe sobrepasar 1,5 mg de oxígeno disuelto/l después de 28 días. Si hay valores superiores a este, deberá hacerse una revisión de las técnicas experimentales. La concentración residual de oxígeno en los frascos del ensayo no deberá bajar por debajo de 0,5 mg/l en ningún momento. Estos valores tan bajos de oxígeno sólo son válidos si el método de determinación del oxígeno disuelto es capaz de medir dichos niveles con exactitud.

Véase también I.5.2

VI.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

VI.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DEL FRASCO CERRADO

1. LABORATORIO

2. FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA

3. SUSTANCIA A EXAMINAR

Nombre:

Concentración de la solución madre: mg/l

Concentración inicial en el frasco: mg/l

DTO/DQO: mg O_2/mg de sustancia a examinar

4. INÓCULO

Fuente:

Tratamiento realizado:

Acondicionamiento previo en su caso:

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: mg/l

5. DETERMINACIÓN DEL OD

Método: Winkler/electrodo

Análisis de los frascos

Tiempo de incubación (d)			OD (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blanco sin sustancia problema	1	C_1				
	2	C_2				
Media	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Sustancia problema	1	a_1				
	2	a_2				
Media	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

N.B.: Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. CORRECCIÓN POR NITRIFICACIÓN (véase Anexo V)

Tiempo de incubación (d)	0	n_1	n_2	n_3
(i) Concentración de nitrato (mg N/l)				
(ii) Cambio en la concentración de nitrato (mg N/l)	—			
(iii) Equivalente de oxígeno (mg/l)	—			
(iv) Concentración de nitrito (mg N/l)				
(v) Cambio en la concentración de nitrito (mg N/l)	—			
(vi) Equivalente de oxígeno (mg/l)	—			
(iii + vi) Equivalente total de oxígeno (mg/l)	—			

7. DEPLECIÓN DE OD: % DE DEGRADACIÓN

	Depleción tras n días (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Frasco 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Frasco 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. del ensayo} \times \text{DTO sustancia}}$				
Frasco 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. del ensayo} \times \text{DTO sustancia}}$				
$\% \text{ D media}^{*} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) No tener en cuenta si hay una diferencia considerable en las repeticiones.

m_{to} = valor a tiempo 0 en el frasco de la prueba

m_{tx} = valor a tiempo t en el frasco de la prueba

m_{bo} = valor medio del blanco a tiempo 0

m_{bx} = valor medio del blanco a tiempo x

Se aplicará también una corrección según la nitrificación basándose en iii + vi de la sección 6.

8. DEPLECIÓN DE OD EN EL BLANCO

Consumo de oxígeno por el blanco: $(m_{bo} - m_{b28})$ mg/l. Este consumo es importante para la validez del ensayo. Debe ser menor de 1,5 mg/l.

PARTE VII. ENSAYO DEL M.I.T.I. (Método C.4-F)

VII.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se mide automáticamente durante un período de 28 días, en un respirómetro cerrado, a 25 ± 1 °C y en la oscuridad, el consumo de oxígeno en una solución o suspensión agitada, de la sustancia problema en un medio mineral, inoculado con un inóculo especial de microorganismos no adaptados. El dióxido de carbono producido es absorbido por cal sodada. La biodegradabilidad se expresa como porcentaje de consumo de oxígeno (corregido según el consumo del blanco) sobre el consumo teórico (DTO). El porcentaje de biodegradabilidad primaria se calcula también basándose en los análisis químicos específicos adicionales hechos al comienzo y al final de la incubación y, opcionalmente, por análisis de COD.

VII.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

VII.2.1. Equipo

a) Medidor electrolítico automático de DBO o respirómetro normalmente equipado con seis frascos, de 300 ml cada uno y que llevan cápsulas para el absorbente de CO_2.

b) Temperatura ambiente constante o baño maría a 25 °C ± 1 °C o más exacta;

c) Conjunto de membrana y filtros (opcional)

d) Analizador de carbono (opcional).

VII.2.2. *Preparación del medio mineral*

Se prepararán las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de calidad analítica y agua (I.6.1.):

(a) Ortofosfato diácido de potasio, KH_2PO_4 — 8,50 g

Ortofosfato monoácido de potasio, K_2HPO_4 — 21,75 g

Ortofosfato monoácido de sodio dodecahidratado $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ — 44,60 g

Cloruro amónico, NH_4Cl — 1,70 g

Disolver en agua y enrasar hasta 1 litro

El pH de la solución debe ser de 7,2

(b) Sulfato de magnesio heptahidratado, $MgSO_4.7\ H_2O$ — 22,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro

(c) Cloruro cálcido anhidro, $CaCl_2$ — 27,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro

(d) Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3.6\ H_2O$ — 0,25 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro

Se toman 3 ml de cada solución (a), (b), (c) y (d) y se enrasa a 1 litro.

VII.2.3. Preparación del inóculo

Se recogen muestras frescas de no menos de 10 puntos, sobre todo en zonas donde se utilicen y viertan diversos productos químicos. En los sitios como las instalaciones de tratamiento de aguas residuales, tratamiento industrial de aguas residuales, ríos, lagos, mares, se recogerá muestras de 1 litro de lodo, suelo superficial, agua, etc. y se mezclarán cuidadosamente. Después de eliminar la materia flotante y de dejar sedimentar, el sobrenadante se ajustará a pH 7 ± 1 con hidróxido sódico o ácido fosfórico.

Se utiliza un volumen adecuado del sobrenadante filtrado para rellenar un recipiente de decantación de lodo activado y se airea el líquido durante 23 h 30 min. Treinta minutos después de detener la aireación, se elimina alrededor de un tercio del volumen total de sobrenadante y se añade al material sedimentado un volumen igual de una solución (pH 7) que contenga 0,1 % respectivamente de glucosa, peptona y ortofosfato monopotásico, volviendo a comenzar la aireación. Este procedimiento se repite una vez al día. La unidad de lodo funcionará de acuerdo con las prácticas correctas: los efluentes deben estar limpios, la temperatura debe permanecer a 25 ± 2 °C, el pH debe ser 7 ± 1, el lodo debe estar bien sedimentado, debe haber aireación suficiente para mantener la mezcla en aerobiosis en todo momento, los protozoos deben estar presentes; al menos cada tres meses se hará un ensayo de la actividad del lodo frente a una sustancia de referencia. No se debe utilizar lodo como inóculo hasta al menos un mes después de la operación, pero no más de cuatro meses después. Posteriormente, tomar muestras de al menos 10 sitios a intervalos regulares, una vez cada tres meses.

A fin de mantener la misma actividad en el lodo reciente y en el antiguo, se mezcla el sobrenadante filtrado de un lodo activado en uso con un volumen igual de sobrenadante filtrado de una mezcla reciente recogida de diez fuentes y se cultiva el líquido combinado tal como se ha dicho anteriormente. Se toma el lodo para usarlo como inóculo de 18 a 24 horas después de haber alimentado la unidad.

VII.2.4. **Preparación de los frascos**

Se preparan los seis frascos siguientes:

No. 1: sustancia problema en agua de dilución en concentración de 100 mg/l

No. 2, 3 y 4: sustancia problema en medio mineral en concentración de 100 mg/l

No. 5: sustancia de referencia (por ejemplo, anilina) en medio mineral en concentración de 100 mg/l

No. 6: medio mineral sólo

Las sustancias problema poco solubles se añaden directamente calculadas en peso o en volumen o se actúa como se describe en el Anexo III, excepto que no se utilizan ni disolventes ni agentes emulsificantes. Se añade el absorbente de CO_2 a todos los frascos en las cápsulas especiales. Se ajusta el pH a 7,0 en los frascos No. 2, 3 y 4.

VII.2.5. **Realización del ensayo**

Se inoculan los frascos No. 2, 3 y 4 (suspensiones problema), No. 5 (control de actividad) y No. 6 (blanco con inóculo) con un pequeño volumen del inóculo de manera que dé una concentración de 30 mg/l de sólidos suspendidos. No se añade inóculo al frasco No. 1 que sirve como control abiótico. Se monta el equipo, se controla la impermeabilidad al aire, se ponen en marcha los agitadores y se comienza la medición del consumo de oxígeno en condiciones de oscuridad. Se controla diariamente la temperatura, el agitador y el registrador culombimétrico de consumo de oxígeno, tomando nota de cualquier cambio de color del contenido de los frascos. El consumo de oxígeno se leerá directamente de los seis frascos por un método apropiado, por ejemplo a partir del registrador gráfico de seis puntos, dando lugar a una curva de DBO. Al final de la incubación, normalmente 28 días, se mide el pH del contenido de los frascos y se determina la concentración de la sustancia problema y/o residual y cualquier intermediario y, en el caso de una sustancia soluble en el agua, la concentración de COD (Anexo II.4). Se tendrá un cuidado especial en el caso de sustancias volátiles. Si se supone que va a haber nitrificación, se determina la concentración de nitrato y de nitrito en la medida de lo posible.

VII.3. DATOS E INFORME

VII.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se divide el consumo de oxígeno (mg) de la sustancia problema después de un tiempo dado, corregido según el consumo del blanco con inóculo después del mismo tiempo, entre el peso de la sustancia problema utilizada. Con ello obtenemos la DBO expresada en mg de oxígeno/mg de sustancia problema, es decir:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg de consumo de } O_2 \text{ sustancia problema} - \text{mg de } O_2 \text{ consumo blanco}}{\text{mg sustancia problema en el frasco}}$$

$$= \text{mg } O_2/\text{mg sustancia problema}$$

La biodegradación porcentual se obtiene de la siguiente manera:

$$\%\ \text{biodegradación} = \%\ \text{DTO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg sustancia)}}{\text{DTO (mg } O_2/\text{mg sustancia)}} \times 100$$

En las mezclas, se calcula la DTO basándose en el análisis elemental, como si fuera una sustancia simple. Se utilizará la DTO adecuada (DTO_{NH4} o DTO_{NO3}) según haya nitrificación nula o completa (Anexo II.2). No obstante, si hay nitrificación pero es incompleta, se corregirá según el oxígeno consumido por la nitrificación, calculado según los cambios en las concentraciones de nitrito y nitrato (Anexo V).

Se calcula el porcentaje de biodegración primaria a partir de la pérdida de sustancia química originaria específica (véase I.7,2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Si ha habido en el frasco No. 1 una pérdida de sustancia problema que dé la medida de la eliminación fisicoquímica, se informará de ello y se utilizará la concentración de la sustancia problema (S_b) después de 28 días en este frasco para calcular el porcentaje de biodegradación.

Cuando se hagan determinaciones de COD (opcional), el porcentaje de biodegradación última se calculará con la siguiente fórmula:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

como se describe en el punto I.7.1. Si ha habido en el frasco No. 1 una pérdida de COD, que mide la eliminación fisicoquímica, se utilizará la concentración de COD en este frasco para calcular el porcentaje de biodegradación.

Se registrarán todos los resultados en la ficha de datos adjunta.

VII.3.2. *Validez de los resultados*

El consumo de oxígeno del blanco con inóculo es normalmente de 20 a 30 mg O_2/l y no debe ser mayor de 60 mg/l en 28 días. Los valores superiores a 60 mg/l exigirán una revisión crítica de los datos y de las técnicas experimentales. Si el pH cae fuera del rango 6-8,5 y el consumo de oxígeno con la sustancia problema es menor del 60 %, debe repetirse el ensayo con una concentración inferior de la sustancia problema.

Véase también I.5.2.

Si el porcentaje de degradación de anilina calculado a partir del consumo de oxígeno no excede del 40 % después de 7 días y del 65 % después de 14 días, el ensayo se considerará no válido.

VII.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

VII.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de una ficha de recogida de datos.

PRUEBA DEL MITI (I)

1. **LABORATORIO**
2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. SUSTANCIA A EXAMINAR

Nombre: ...

Concentración de la solución madre: ... mg/l, en sustancia

Concentración inicial en el medio, C_o: ... mg/l, en sustancia

Volumen de la mezcla de reacción, V: ... ml

DTO de la sustancia: ... mg O_2/l

4. INÓCULO

Puntos de muestreo del lodo:

1) ... 6) ...
2) ... 7) ...
3) ... 8) ...
4) ... 9) ...
5) ... 10) ...

Concentración de sólidos en suspensión en el lodo activado tras aclimatación con vertidos sintéticos = ... mg/l

Volumen de lodo activado por litro de medio final = ... ml

Concentración de lodo en el medio final = ... mg/l

5. CONSUMO DE OXÍGENO: BIODEGRADABILIDAD

Tipo de respirómetro usado:

			Tiempo (días)				
			0	7	14	21	28
Consumo O_2 (mg) de la sustancia problema	a_1						
	a_2						
	a_3						
Consumo O_2 (mg) blanco	b						
Consumo O_2 corregido (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
DBO por mg de sustancia problema	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Frasco 1					
		Frasco 2					
		Frasco 3					
% degradación $\frac{DBO}{DTO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		media *					

* No tener en cuenta si hay una diferencia considerable en las repeticiones.

N.B.: Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. ANÁLISIS DE CARBONO (opcional)

Analizador de carbono:

Matraz	COD				%COD eliminado	Media
	Medido		Corregido			
Agua + sust. a examinar	a					
Lodo + sust. a examinar	b_1		$b_1 - c$			
Lodo + sust. a examinar	b_2		$b_2 - c$			
Lodo + sust. a examinar	b_3		$b_3 - c$			
Control blanco	c		–			

$$\% \text{ COD eliminado: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7 DATOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO

	Cantidad residual de sust. problema al final del ensayo	% degradación
Ensayo blanco con agua	S_b	
Medio inoculado	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradación} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calcular % de degradación de los frascos a_1, a_2 y a_3 respectivamente.

8. COMENTARIOS

Se adjuntará una curva de DBO en función del tiempo, si se dispone de ella.

ANEXO I

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

OD: Oxígeno disuelto (mg/l); es la concentración de oxígeno disuelto en una muestra acuosa.

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno (g); es la cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos que metabolizan una sustancia problema; se expresa también como gramos de oxígeno consumido por gramo de sustancia problema. (Véase método C.5.).

DQO: Demanda química de oxígeno (g); es la cantidad de oxígeno consumido durante la oxidación de una sustancia problema con dicromato en medio ácido caliente. Proporciona una medida de la cantidad de sustancia oxidable presente; se expresa también como gramos de oxígeno consumido por gramo de sustancia problema. (Véase método C.6.)

COD: Carbono orgánico disuelto; es el carbono orgánico presente en solución o el que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros o permanece en el sobrenadante tras centrifugación a 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) durante 15 minutos.

DTO: Demanda teórica de oxígeno (mg); es la cantidad total de oxígeno necesario para oxidar completamente una sustancia; se calcula basándose en la fórmula molecular (véase Anexo II.2) y se expresa también como mg de oxígeno requeridos por mg de sustancia problema.

CO_2T: Dióxido de carbono teórico (mg); es la cantidad de dióxido de carbono que se calcula que va a producirse a partir del contenido en carbono, conocido o medido, de la sustancia problema cuando se mineraliza completamente; se expresa también como mg de dióxido de carbono producido por mg de sustancia de ensayo.

COT: Carbono orgánico total; es la suma total del carbono orgánico en solución y en suspensión en una muestra.

CI: Carbono inorgánico,

CT: Carbono total; es el total del carbono orgánico e inorgánico presente en una muestra.

Biodegradación primaria:

Es la alteración de la estructura química de una sustancia, producida por acción biológica y que da lugar a la pérdida de las propiedades específicas de esa sustancia.

Biodegradación última (aerobia):

Es el nivel de degradación al que llega la sustancia de ensayo cuando es totalmente utilizada por microorganismos dando lugar a la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

Fácilmente biodegradable:

Categoría arbitraria de sustancias químicas que han pasado determinados ensayos específicos de clasificación en cuanto a la biodegradabilidad última; estos ensayos son tan estrictos que es asumido que, según ellos, estos compuestos deben degradarse rápida y completamente en medio ambiente acuático en condiciones de aerobiosis.

Intrínsecamente biodegradable:

Categoría de sustancias químicas en las que hay evidencia inequívoca de biodegradación (primaria o última) en un ensayo de biodegradabilidad reconocido.

Tratabilidad:

Es la capacidad de las sustancias de ser eliminadas durante el tratamiento biológico de los residuos acuosos sin afectar negativamente al funcionamiento normal de los procesos de tratamiento. Generalmente, los compuestos fácilmente biodegradables son tratables, pero no todos los compuestos intrínsecamente biodegradables son tratables. Pueden darse también procesos abióticos.

Tiempo de latencia

En una prueba de pérdida, es el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta que el porcentaje de degradación aumenta hasta al menos el 10 %. El tiempo de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

Tiempo de degradación

Es el tiempo transcurrido desde el final del tiempo de latencia hasta el momento en que se alcanza el 90 % del nivel máximo de degradación.

Período de observación de 10 días

Son los 10 días que siguen inmediatamente al momento en que se alcanza el 10 % de degradación.

ANEXO II

CÁLCULO Y DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS INDICATIVOS ADECUADOS

Dependiendo del método elegido, se necesitarán determinados parámetros indicativos. La sección siguiente describe el cálculo de esos valores. El uso de estos parámetros se describe en cada uno de los métodos.

1. **Contenido en carbono**

El contenido en carbono se calcula basándose en la composición elemental conocida o determinada por análisis elemental de la sustancia problema.

2. **Demanda teórica de oxígeno (DTO)**

La demanda teórica de oxígeno (DTO) puede calcularse si se conoce la composición elemental o se determina mediante análisis elemental. Para un compuesto:

$$C_cH_hCl_clN_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

sin nitrificación,

$$DTO_{NH4} = \frac{16\,(2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o)}{Pm}\ mg/mg$$

o con nitrificación

$$DTO_{NO3} = \frac{16\,(2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o)}{Pm}\ mg/mg$$

3. **Demanda química de oxígeno (DQO)**

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina de acuerdo con el método C.6.

4. **Carbono orgánico disuelto (COD)**

El carbono orgánico disuelto (COD) es, por definición, el carbono orgánico de cualquier sustancia o mezcla de sustancias en agua que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros.

Se toman muestras de los recipientes de ensayo y se filtran inmediatamente en el equipo de filtración utilizando un filtro de membrana adecuado. Se desprecian los primeros 20 ml de filtrado (puede disminuirse la cantidad si se utilizan filtros más pequeños). Si se inyectan volúmenes de 10 a 20 ml o menores (el volumen depende de la cantidad necesaria para el analizador de carbono), se guardan para el análisis de carbono. La concentración de COD se determina mediante un analizador de carbono orgánico capaz de medir exactamente una concentración de carbono equivalente o inferior al 10 % de la concentración de COD inicial utilizada en el ensayo.

Las muestras filtradas que no puedan analizarse en el mismo día de trabajo pueden conservarse almacenadas en un refrigerador a 2 – 4 °C durante 48 horas, o por debajo de – 18 °C durante periodos más prolongados.

Comentarios:

Los filtros de membrana vienen a menudo impregnados con agentes tensoactivos para hacerlos hidrófilos. Así pues, el filtro puede contener varios mg de carbono orgánico soluble que puede interferir en las determinaciones de biodegradabilidad. Los agentes tensoactivos y otros compuestos orgánicos solubles se eliminan de los filtros hirviendo éstos en agua desionizada durante tres periodos de 1 hora cada uno. Los filtros pueden almacenarse a continuación en agua durante una semana. Si se utilizan cartuchos de filtro de un solo uso, cada lote debe controlarse para confirmar que no libera carbono orgánico soluble.

Dependiendo del tipo de filtro de membrana, la sustancia puede ser retenida por absorción. Por ello, es aconsejable asegurarse de que la sustancia problema no queda retenida en el filtro.

Puede usarse *centrifugación*, en lugar de filtración, a 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) durante 15 minutos para diferenciar el COT del COD. El método no es fiable con una concentración inicial < 10 mg COD/l ya que ni se eliminan todas las bacterias ni se redisuelve el carbono que forma parte del plasma bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

ANEXO III

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS POCO SOLUBLES

Debe prestarse una atención especial, en los ensayos de biodegradabilidad de sustancias poco solubles, a los aspectos siguientes.

Aunque los líquidos homogéneos rara vez presentarán problemas de muestreo, se recomienda homogeneizar los materiales sólidos por medios apropiados para evitar errores debidos a la no homogeneidad. Debe prestarse una atención especial cuando se necesiten muestras representativas de unos miligramos tomadas de mezclas de sustancias químicas o de sustancias con grandes cantidades de impurezas.

Pueden utilizarse durante los ensayos diversas formas de agitación. Debe tenerse cuidado de usar sólo la agitación suficiente para mantener la dispersión de la sustancia, evitando el sobrecalentamiento, la formación excesiva de espuma y las fuerzas de cizallamiento excesivas.

Puede utilizarse un emulsificante que dé una dispersión estable de la sustancia química. Debe ser atóxico para las bacterias y no debe biodegradarse ni producir espuma en las condiciones del ensayo.

Se aplicarán a los solventes los mismos criterios que a los emulsificantes.

No se recomienda utilizar vehículos sólidos para los ensayos de sustancias sólidas, pero pueden ser adecuados en el caso de sustancias oleosas.

Cuando se utilicen sustancias auxiliares como emulsificantes, solventes y portadores, debe realizarse un ensayo en blanco con las sustancias auxiliares.

Puede utilizarse para estudiar la biodegradabilidad de las sustancias poco solubles cualquiera de los tres ensayos respirométricos CO_2, DBO o MITI.

BIBLIOGRAFÍA

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly- soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

ANEXO IV

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE PUEDEN SER TÓXICAS PARA EL INÓCULO

Cuando se someta una sustancia química a ensayos de biodegradabilidad fácil y se vea que no es biodegradable, se recomienda el procedimiento siguiente si se desea distinguir si la sustancia es inhibidora o es inerte (Reynolds et al.; 1987).

Deben utilizarse inóculos similares o idénticos para los ensayos de toxicidad y de biodegradación.

Cuando se considere necesario disponer de un medio para valorar la toxicidad de las sustancias químicas estudiadas en los ensayos de biodegradabilidad fácil, puede ser apropiado aplicar uno o varios de los métodos siguientes: inhibición de la tasa de respiración del lodo (ensayo de inhibición de respiración del lodo activado — Directiva 88/302/CEE), DBO o inhibición del crecimiento.

Si hay que evitar la inhibición debida a la toxicidad, se sugiere que las concentraciones de la sustancia problema utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad fácil sean inferiores a 1/10 de la CE_{50} (o inferiores a los valores de la CE_{20}) obtenida en los ensayos de toxicidad. No es probable que sustancias con una CE_{50} superior a 300 mg/l tengan efectos tóxicos en los ensayos de biodegradabilidad fácil.

Los valores de CE_{50} menores de 20 mg/l pueden plantear graves problemas en los ensayos subsiguientes. Se emplearán bajas concentraciones de ensayo, haciendo necesario el uso de pruebas sensibles y estrictas como el ensayo del frasco cerrado o el uso de material marcado con ^{14}C. Como alternativa, un inóculo aclimatado puede permitir el uso de concentraciones más elevadas de la sustancia problema. En este último caso, sin embargo, se pierde el criterio específico del ensayo de biodegradabilidad fácil.

BIBLIOGRAFÍA

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

ANEXO V

CORRECCIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO POR INTERFERENCIA DE LA NITRIFICACIÓN

Si la sustancia problema no contiene nitrógeno, los errores debidos a no tener en cuenta la nitrificación, en el cálculo del consumo de oxígeno, son despreciables (no superiores al 5 %), incluso si la oxidación del N amónico en el medio se da irregularmente en los distintos recipientes de ensayo y blanco. No obstante, en el caso de sustancias que contienen N, pueden darse errores graves.

Si ha habido nitrificación pero no es completa, el consumo de oxígeno que se ha observado en la mezcla de reacción puede corregirse según la cantidad de oxígeno utilizado para oxidar el amonio a nitrito y nitrato, si se determinan los cambios en la concentración del nitrito y del nitrato durante la incubación mediante las ecuaciones siguientes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalmente:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

En la ecuación (1) el consumo de oxígeno por 28 g de nitrógeno contenidos en cloruro amónico (NH_4Cl) al ser oxidado a nitrito es de 96 g, es decir, un factor de 3,43 (96/28). Del mismo modo, en la ecuación (3) el consumo de oxígeno por 28 g de nitrógeno al ser oxidado a nitrato es de 128 g, es decir, un factor de 4,57 (128/28).

Como las reacciones son *secuenciales*, desencadenadas por especies bacterianas diferentes bien determinadas, es posible que la concentración de nitrito aumente o disminuya; en este último caso, se formará una concentración equivalente de nitrato. Así pues, el oxígeno consumido en la formación de nitrato es 4,57 multiplicado por el aumento de la concentración de nitrato, mientras que el oxígeno relacionado con la formación de nitrito es 3,43 multiplicado por el aumento en la concentración de nitrito o bien con la disminución de su concentración, la pérdida de oxígeno es − 3,43 multiplicado por la disminución de la concentración.

Es decir:

O_2 consumido en la formación de nitrato-N = 4,57 × aumento en la concentración de nitrato (4)

y

O_2 consumido en la formación de nitrito-N = 3,43 × aumento en la concentración de nitrito (5)

y

O_2 perdido en la desaparición de nitrito-N = − 3,43 × disminución en la concentración de nitrito (6)

de forma que

consumo de O_2 debido a la nitrificación = ± 3,43 × cambio en concentración de nitrito-N + 4,57 × aumento en concentración de nitrato (7)

y, por consiguiente,

consumo de O_2 debido a oxidación del C = consumo total observado menos consumo debido a nitrificación (8)

Si sólo se determina el N oxidado total, puede considerarse que el consumo de oxígeno debido a la nitrificación es, como primera aproximación, 4,57 × aumento del N oxidado.

El valor corregido del consumo de oxígeno debido a la oxidacion del C se compara entonces con la DTO NH_4 tal como se calcula en el Anexo II.

C.5. DEGRADACIÓN: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del ensayo es medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de las sustancias orgánicas, sólidas o líquidas.

Los resultados que se obtienen con este método de ensayo son representativos, sobre todo, cuando se aplica a los compuestos hidrosolubles; no obstante, al menos en principio, el método puede hacerse extensible a los compuestos volátiles y los compuestos de baja hidrosolubilidad.

El método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas que no produzcan efectos inhibidores sobre las bacterias a la concentración de ensayo. Si la sustancia de ensayo no es soluble a la concentración de ensayo, se puede recurrir a procedimientos especiales, tales como la dispersión por ultrasonidos, a fin de lograr una dispersión satisfactoria de la sustancia de ensayo.

Es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia para poder interpretar los resultados bajos y para elegir la concentración de ensayo adecuada.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La DBO se define como la masa de oxígeno disuelto necesario para asegurar, en condiciones determinadas, la oxidación bioquímica de un volumen dado de una solución de la sustancia sometida a ensayo.

Los resultados se expresan en gramos de DBO por gramo de sustancia de prueba.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Es conveniente la utilización de una sustancia de referencia apropiada para verificar la actividad del inóculo.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se siembra con microorganismos y se incuba en la obscuridad a una temperatura ambiente constante dada, una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en un medio apropiado y aireado.

La DBO se determina por la diferencia entre el contenido en oxígeno disuelto al principio y al final del ensayo. La duración mínima del ensayo es de cinco días y la máxima, de 28.

Debe efectuarse un ensayo paralelo en blanco, sin sustancia de ensayo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La determinación de la DBO no puede considerarse como una determinación válida de la biodegradabilidad de la sustancia. Esta prueba sólo puede considerarse como prueba exploratoria.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una solución o una dispersión preliminar de la sustancia, con el fin de obtener una concentración de DBO compatible con el método utilizado. La DBO se determina entonces aplicando un método nacional o internacional normalizado que sea apropiado.

2. RESULTADOS Y EVALUACIÓN

La DBO contenida en la solución preliminar se calcula según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DBO por gramo de sustancia de ensayo.

3. INFORME

Debe indicarse el método utilizado.

La demanda bioquímica de oxígeno debe ser la media de al menos tres mediciones válidas.

Para facilitar la interpretación de los resultados deben incluirse todos los datos y observaciones que sean pertinentes, especialmente en lo referente a impurezas, estado físico, efectos tóxicos y propiedades específicas de la sustancia que puedan afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se ha utilizado un aditivo inhibidor de la nitrificación biológica.

4. BIBLIOGRAFÍA

Lista de métodos normalizados, por ejemplo:

NF T 90-103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand

NBN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The Determination of Biochemical Oxygen Demand, Methods for the Examination of Water and Associates Materials, HMSO, Londres.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. DEGRADACIÓN: DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del ensayo es medir la demanda química de oxígeno (DQO) de las sustancias orgánicas, sólidas o líquidas, mediante la aplicación de cualquier procedimiento normalizado, en condiciones de laboratorio determinadas.

Es conveniente disponer de información sobre la fórmula de la sustancia para facilitar la realización del ensayo y la interpretación de los resultados obtenidos (por ejemplo, sales halógenas, sales ferrosas de compuestos orgánicos, compuestos organoclorados).

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La demanda química de oxígeno es la medida de la oxidabilidad de una sustancia, definida como la cantidad equivalente en oxígeno de un reactivo oxidante consumida por la sustancia en condiciones de laboratorio determinadas.

El resultado se expresa en gramos de DQO por gramo de sustancia de ensayo.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es preciso emplear sustancias de referencia cada vez que se analiza una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven, principalmente, para calibrar periódicamente el método y permitir la comparación de resultados cuando se apliquen métodos distintos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en agua, se oxida con dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico concentrado, con catalizador de sulfato de plata, en caliente y con reflujo durante dos horas. El dicromato residual se valora con ayuda de sulfato ferroso amónico titulado.

En el caso de las sustancias con cloro, se debe añadir sulfato mercúrico (las soluciones que contienen sales de mercurio deben ser tratadas, después de su utilización, pra evitar que pase mercurio al medio ambiente) para atenuar la interferencia de los cloruros.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Dada la arbitrariedad del método de determinación de la DQO, ésta debe considerarse como un «indicador de oxidabilidad» y se utiliza en calidad de tal como método práctico de evaluación de la materia orgánica.

Los cloruros pueden interferir en este ensayo; las sustancias inorgánicas reductoras u oxidantes pueden interferir igualmente con la determinación de la DQO.

Algunos compuestos cíclicos y muchas sustancias volátiles (p.ej., ácidos grasos de cadena corta) no se oxidan totalmente durante el ensayo.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una solución o una dispersión preliminar de la sustancia, para conseguir una DQO de 250 a 600 mg por litro.

Notas:

Cuando se trata de sustancias poco solubles y que no se dispersan, se puede pesar una cantidad de sustancia finamente pulverizada, o en estado líquido, correspondiente a unos 5 mg de DQO, e introducirla en el aparato experimental añadiendo agua.

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina a menudo mejor, sobre todo en el caso de sustancias poco solubles, con una variante del método, es decir, en un sistema cerrado con ecualizador de presión (H. Kelkenberg, 1975). Con esta modificación puede conseguirse cuantificar sustancias que se determinan con mucha dificultad cuando se usa el método convencional (p. ej., ácido acético). Sin embargo, el método falla igualmente en el caso de la piridina. Si se alcanza una concentración de dicromato potásico de 0,25 N (0,0416 M), como se prescribe en la referencia (1), se facilita la adición directa de 5-10 mg de sustancia, lo que resulta esencial para la determinación de la DQO de las sustancias poco hidrosolubles (ref. (2)).

Por lo demás, la DQO se determina a continuación aplicando cualquier método nacional o internacional normalizado que sea adecuado.

2. RESULTADOS Y EVALUACIÓN

Se calcula la DQO contenida en el frasco experimental según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DQO por gramo de sustancia de ensayo.

3. INFORME

Debe indicarse el método utilizado.

La demanda química de oxígeno debe ser la media de al menos tres mediciones. Se incluirán todos los datos y observaciones que puedan facilitar la interpretacion de los resultados, especialmente los referentes a impurezas, estado físico y propiedades específicas de la sustancia (si se conocen) que puedan afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se ha usado sulfato mercúrico para reducir la interferencia de los cloruros.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Lista de métodos normalizados, por ejemplo:

NBN T 91-201 Determination of the Chemical Oxygen Demand

ISBN 0 11 7512494 Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters

NF T 90-101 Determination of the Chemical Demand

DS 217 — Water Determination of the Chemical Oxygen Demand

Analysis

DIN 38409-H-41 Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik

ISO 6060 Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods

C.7. DEGRADACIÓN ABIÓTICA HIDRÓLISIS EN FUNCIÓN DEL pH

1. MÉTODO

Este método se basa en el descrito en las líneas directrices de la OCDE (1)

1.1. INTRODUCCIÓN

La hidrólisis es una reacción importante que controla la degradación abiótica. Esta reacción es particularmente importante en las sustancias poco biodegradables, y puede influir en la persistencia de una sustancia en el medio ambiente.

La mayor parte de las reacciones de hidrólisis son de seudo primer orden y, por lo tanto, los tiempos de semireacción son independientes de la concentración. Esto permite, normalmente, extrapolar los resultados obtenidos en concentraciones de laboratorio a las condiciones ambientales.

Además, existen varios ejemplos (2), que muestran una concordancia satisfactoria entre los resultados obtenidos en agua pura y en agua natural con varios tipos de productos químicos.

Para realizar este ensayo es conveniente disponer de informaciones preliminares sobre la presión de vapor de la sustancia.

Este método sólo es aplicable a las sustancias hidrosolubles. Las impurezas pueden influir en los resultados.

El comportamiento hidrolítico de las sustancias químicas debería estudiarse con los valores de pH más normales en el medio ambiente (pH de 4 a 9).

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La hidrólisis se define como la reacción de un producto químico RX con el agua. Esta reacción puede estar representada por un cambio neto del radical X por OH:

$$RX + HOH - ROH + HX \qquad [1]$$

La velocidad a la cual disminuye la concentración de RX viene dada por la relación:

$$\text{velocidad} = k \cdot [H_2O] \cdot [RX] \qquad [2]$$

Dado que la cantidad de agua presente excede en mucho a la sustancia química, este tipo de reacción se describe normalmente como una reacción de seudo primer orden, en la que la constante de velocidad observada viene dada por la relación:

$$k_{obs} = k \cdot [H_2O] \qquad [3]$$

Esta constante puede ser determinada para un valor de pH y una temperatura T, utilizando la expresión

$$k_{obs} = \frac{2{,}303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \qquad [4]$$

donde:

t = tiempo

C_0 = concentración de la sustancia al tiempo 0

C_t = concentración de la sustancia al tiempo t

2,303 = factor de conversión entre los logaritmos neperianos y los decimales.

Las concentraciones se expresan en g/l o mol/l.

La dimensión de la constante k_{obs} es (tiempo)$^{-1}$.

El tiempo de semivida $t_{\frac{1}{2}}$ se define como el tiempo necesario para reducir en un 50 % la concentración de la sustancia química de ensayo, es decir:

$$C_t = \tfrac{1}{2}\, c_0 \qquad [5]$$

De las expresiones [4] y [5] se puede deducir que

$$t_{\frac{1}{2}} = 0{,}693/k_{obs} \qquad [6]$$

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se estudia una nueva sustancia. Deben servir esencialmente para controlar de vez en cuando la eficacia del método y permitir la comparación con los resultados obtenidos con otro método.

Se han utilizado como sustancias de referencia las sustancias siguientes (1):

Acido acetilsalicílico (Aspirina)

0,0-dietil 0-(6-metil-2-(1-metiletil)4-pirimidinil)-éster del ácido fósforotioico (Dimpilato, Diazinon)

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia se disuelve en el agua a una concentración baja, controlándose el pH y la temperatura.

La disminución de la concentración de la sustancia en el transcurso del tiempo se sigue mediante cualquier procedimiento analítico que sea apropiado.

Los logaritmos de las concentraciones de la sustancia se llevan a una gráfica frente al tiempo y, si se obtiene una recta, puede obtenerse la constante de velocidad de primer orden por la pendiente de la misma (véase el punto 2).

Cuando no se puede determinar inmediatamente una constante de velocidad para una temperatura determinada, el valor de esta constante se estima normalmente mediante la relación de Arrhenius, que da la dependencia de la constante de velocidad en función de la temperatura. De la gráfica lineal del logaritmo de la constante de velocidad, tal como se ha determinado a la temperatura apropiada en función de la inversa de la temperatura absoluta (K), se puede extrapolar el valor de la constante de velocidad que no se había podido obtener directamente.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La referencia (2) cita que las medidas de constante de velocidad de hidrólisis para 13 clases de estructuras orgánicas pueden ser de gran precisión.

La repetibilidad depende, en particular, del control del valor del pH y de la temperatura y podría verse afectada por la presencia de microorganismos y en algún caso especial por la concentración de oxígeno disuelto.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. Reactivos

1.6.1.1. *Soluciones tampón de pH*

El ensayo se efectúa con tres valores de pH: 4,0, 7,0 y 9,0.

Para ello deberán prepararse soluciones tampón utilizando productos químicos de grado de reactivo y agua destilada o desionizada estéril. En el Apéndice se presentan algunos ejemplos de soluciones tampón.

La solución amortiguadora de pH utilizada puede influir sobre la velocidad de la hidrólisis; en ese caso debe utilizarse otra solución tampón. En la referencia (2) se recomienda la utilización de tampones de borato o acetato en lugar de fosfato.

Si se desconoce el valor del pH de las soluciones tampón a la temperatura de ensayo, deberá determinarse con ayuda de un pHmetro calibrado a la temperatura elegida con una precisión de ± 0,1 unidades de pH.

1.6.1.2. *Soluciones de ensayo*

La sustancia de ensayo debe disolverse en la solución tampón elegida a una concentración que no sobrepase 0,01 M o bien la mitad de la concentración de saturación, si este valor es inferior.

La utilización de disolventes orgánicos miscibles con el agua sólo se recomienda para las sustancias poco hidrosolubles.

La cantidad de disolvente deberá ser inferior al 1 % y no deberá interferir con el proceso hidrolítico.

1.6.2. Equipo

Deberán emplearse matraces cerrados de cristal, pero hay que evitar la utilización de grasa en los esmerilados.

Si la sustancia o la solución tampón que se utilizan son volátiles, o si el ensayo se realiza a temperaturas elevadas, es preferible utilizar tubos sellados o cerrados, llenándolos completamente.

1.6.3. Método analítico

El método para determinar la sustancia de ensayo a las concentraciones de la solución de ensayo debe ser específico y puede consistir en una combinación de varios métodos analíticos apropiados.

El método analítico se elegirá en función de la naturaleza de la sustancia de ensayo y será suficientemente preciso y sensible para detectar una disminución del 10 % de la concentración inicial.

1.6.4. Condiciones de ensayo

Los ensayos se realizarán utilizando un recinto termostático controlado o un baño a temperatura constante a ± 0,5 °C de la temperatura elegida. Se mantendrá la temperatura y se medirá dentro del límite de ± 0,1 °C. Las interferencias fotolíticas deberán evitarse por medios adecuados.

Será necesario eliminar el oxígeno disuelto en el caso de las sustancias fácilmente oxidables (por ejemplo, borboteando nitrógeno o argón durante 5 minutos antes de preparar la solución).

1.6.5. Procedimiento del ensayo

1.6.5.1. *Ensayo preliminar*

Deberá hacerse un ensayo preliminar para todas las sustancias a 50 °C ± 0,5 °C con tres valores de pH: 4,0, 7,0 y 9,0.

Se tomará un número de medidas suficientes, de forma que se pueda estimar si, para cada valor de pH y a una temperatura de 50 °C, el tiempo de semivida ($t_{1/2}$) es inferior a 2,4 horas, o si al cabo de 5 días se observa menos del 10 % de la hidrólisis. (Se puede considerar que estos valores corresponden, respectivamente, a tiempos de semivida inferiores a un día o superiores a un año en condiciones más representativas de las del medio ambiente (25 °C)).

Si el ensayo preliminar indica que, para cada uno de los valores de pH, (4, 7 y 9), el 50 %, o más de la sustancia de ensayo ha sido hidrolizado en 2,4 horas a 50 °C o que menos del 10 % ha sido hidrolizado al cabo de 5 días, no se necesita proseguir los ensayos.

En otros casos y para aquellos valores de pH con los que no se hayan cumplido estas condiciones, se efectuará el ensayo nº 1.

1.6.5.2. *Ensayo nº 1*

El ensayo nº 1 se realiza a una temperatura dada, preferentemente a 50 °C ± 0,5 °C y, si fuera posible, en condiciones estériles, con los valores de pH que en los ensayos preliminares hayan mostrado la necesidad de efectuar ensayos suplementarios.

Para determinar el comportamiento de seudo primer orden a los valores de pH especificados, debe escogerse un número suficiente de muestras (no menos de 4) con el fin de cubrir un intervalo del 20 al 70 % de hidrólisis. Para cada valor de pH se determina el orden de la reacción.

Estimación de la constante de velocidad a 25 °C.

La elección del procedimiento experimental depende del resultado del ensayo nº 1, es decir, si la reacción es o no de seudo primer orden.

Si los resultados del ensayo nº 1 no permiten determinar con certeza que la reacción es de seudo primer orden, deben proseguirse los experimentos, tal como se describen en el ensayo nº 2.

Si del resultado del ensayo nº 1 se puede concluir, sin lugar a dudas, que la reacción es de seudo primer orden, deberán proseguirse los experimentos según lo descrito en el ensayo nº 3. (En algunas circunstancias también se puede calcular la constante de velocidad a 25 °C sobre la base de las constantes determinadas a 50 °C, utilizando los resultados del ensayo nº 1 (véase el punto 3.2).

1.6.5.3. *Ensayo nº 2*

Este ensayo se efectuará para cada pH en el que el ensayo nº 1 haya indicado la necesidad de continuar así los experimentos:

— bien a una temperatura inferior a 40 °C,

— o a dos temperaturas, por encima de los 50 °C, con una diferencia de 10 °C, por lo menos, entre ambas.

Para cada valor de pH y para cada temperatura a que se efectúe el ensayo nº 2, se medirán por lo menos seis puntos, espaciados convenientemente, de manera que los porcentajes de hidrólisis abarquen un intervalo del 20 al 70 %.

Para un mismo valor de pH y una misma temperatura se efectuará una determinación por duplicado. Cuando el ensayo nº 2 se efectúe a dos temperaturas por encima de 50 °C, la determinación por duplicado se realizará, preferentemente, a la más baja de ellas.

Para cada valor de pH y para cada temperatura a que se efectúe el ensayo nº 2, se dará, si fuere posible, una estimación gráfica del tiempo de semivida ($t_{\frac{1}{2}}$).

1.6.5.4. *Ensayo nº3*

Este ensayo se realizará para cada valor de pH cuyos resultados en el ensayo nº 1 así lo hayan indicado:

— bien a una temperatura inferior a 40 °C,

— o a dos temperaturas por encima de los 50 °C, con una diferencia de 10 °C, por lo menos, entre ambas.

Para cada valor de pH y para cada temperatura a que se efectúe el ensayo nº 3, se elegirán tres puntos de determinación, el primero en tiempo 0 y el segundo y tercero cuando los porcentajes de hidrólisis sean superiores al 30 %; deberán calcularse la constante k_{obs} y el $t_{\frac{1}{2}}$.

2. RESULTADOS

En el caso de un comportamiento de seudo primer orden pueden obtenerse los valores de k_{obs} para cada valor de pH y cada temperatura de ensayo a partir del gráfico de los logaritmos de las concentraciones en función del tiempo, utilizando la expresión:

$$k_{obs} = -\text{pendiente} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

Además, $t_{\frac{1}{2}}$ puede calcularse según la ecuación [6].

Hay que estimar $k_{25\,°C}$ aplicando la ecuación de Arrhenius cuando sea apropiado.

En el caso de que el comportamiento no sea de *pseudo* primer orden, véase el punto 3.1.

3. INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— las especificaciones de la sustancia,

— cualquier resultado que se obtenga con sustancias de referencia,

— el principio y los detalles del método analítico usado,

— para cada ensayo: la temperatura, el valor del pH, la composición de la solución tampón y la tabla de todos los puntos experimentales concentración-tiempo,

— en el caso de reacciones de seudo primer orden, los valores de $t_{\frac{1}{2}}$ y k_{obs}, así como el método de cálculo,

— en el caso de las reacciones que no sean de seudo primer orden, establecer el gráfico de los logaritmos de las concentraciones en función del tiempo,

— cualquier información y observación que sea necesaria para la interpretación de los resultados.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A veces es posible calcular valores aceptables de la constante de velocidad (a 25 °C) de las sustancias de ensayo, siempre que ya existan valores experimentales de la energía de activación para homólogos de la sustancia química y siempre que pueda aceptarse razonablemente que la energía de activación de la sustancia de ensayo es de igual magnitud.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París, 1981, Test guideline 111. Decision of the Council, C(81) 30 Final.

(2) W. Mabey y T. Mill, «Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions,» J. Phys. Chem. Ref. Data, 197, vol. 7 (2), 383-415.

Apendice

Soluciones tampón

A. CLARK Y LUBS

Los valores de pH que se indican han sido calculados a partir de medidas de potencial utilizando las ecuaciones estándar de Sörensen (1909). Los valores reales de pH son 0,04 unidades más elevados que los valores de la tabla.

Composición	pH
ftalato ácido de potasio 0,1 M + HCl 0,1 N a 20 °C	
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml de ftalato, completar hasta 100 ml	3,8
ftalato ácido de potasio 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de ftalato, completar hasta 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml de ftalato, completar hasta 100 ml	4,2
fosfato monopotásico 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C	
23,45 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de fosfato, completar hasta 100 ml	6,8
29,63 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de fosfato, completar hasta 100 ml	7,0
35,00 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de fosfato, completar hasta 100 ml	7,2

H_3BO_3 0,1 M en KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C

16,30 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de ácido bórico, completar hasta 100 ml	8,8
21,30 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de ácido bórico, completar hasta 100 ml	9,0
26,70 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de ácido bórico, completar hasta 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF Y VLEESCHOUWER

Composición	pH
Citrato monopotásico 0,1 M y NaOH 0,1 N a 18 °C (añadir un fino cristal de timol para evitar la formación de mohos).	
2,0 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de citrato, completar hasta 100 ml	3,80
9,0 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de citrato, completar hasta 100 ml	4,0
16,3 ml de NaOH 0,1 N + 50 ml de citrato, completar hasta 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

bórax 0,05 M + HCl 0,1 N

Composición		pH			
Bórax (ml)	HCl (ml)	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

bórax 0,05 M + NaOH 0,1 N

Composición		pH			
Bórax (ml)	NaOH (ml)	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12

BIODEGRADACIÓN

C.8. PRUEBA ZAHN — WELLENS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objeto de este método es la evaluación de la máxima degradación potencial de sustancias orgánicas solubles en agua y no volátiles, cuando se encuentran expuestas a concentraciones relativamente elevadas de microorganismos en un ensayo estático.

Puede producirse una absorción físico-química sobre los sólidos en suspensión y esto hay que tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los resultados (vease 3.2).

Las sustancias que vayan a estudiarse serán utilizadas en concentraciones equivalentes a valores de COD entre los 50 y 400 mg/litro o valores de DQO entre los 100 y 1 000 mg/litro (COD = carbón organico disuelto; DQO = demanda quimica de oxigeno). Estas concentraciones relativamente elevadas tienen la ventaja de ser analíticamente fiables. Los compuestos con propiedades tóxicas pueden retardar o inhibir el proceso de degradación.

En este metodo, la medida de la concentración de carbón orgánico disuelto, o la demanda de oxigeno químico, se utiliza para calcular la biodegradación máxima de la sustancia objeto del ensayo.

La utlización simultánea de un metodo analítico especifico puede permitir calcular la biodegradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre)

Este método es aplicable solamente a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

— sean solubles en agua en las condiciones del ensayo

— tengan una presión de vapor insignificante en las condiciones del ensayo

— no provoquen inhibición en las bacterias

— sean absorbidas dentro del sistema del ensayo sólo hasta un cierto punto limitado

— no se pierdan a causa de la formación de espuma a partir de la solución del ensayo.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material del ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

1.2. Definiciones y unidades

La cantidad de degradación alcanzada al final del ensayo se presenta como la biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_V)}{(C_D - C_{VD})}\right] \times 100$$

D_T = biodegradación (%) en el tiempo T

C_D = valores de COD (o DQO) en la mezcla del ensayo medidos tres horas después del comienzo del mismo (mg/l). (COD = Carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxigeno)

C_T = valores de COD o DQO en la mezcla del ensayo en el momento en que se toma la muestra (mg/l)

C_V = valores de COD o DQO del blanco en el momento de la toma de la muestra (mg/l)

C_{VD} = valores de COD y DQO en el blanco, medidos 3 horas después del comienzo de la prueba (mg/l).

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana.

El porcentaje de degradación se expresa como el porcentaje de supresión de COD (o DQO) de la sustancia objeto del ensayo.

La diferencia entre los valores medidos tras 3 horas y el valor inical calculado, o preferiblemente medido, puede proporcionar una información útil sobre la eliminación de la sustancia (véase 3.2 «Interpretación de los resultados»).

1.3. **Sustancias de referencia**

En algunos casos, cuando se estan investigando sustancias nuevas, las sustancias de referencia pueden resultar utiles; no obstante, todavia no se pueden recomendar sustancias de referencia especificas.

1.4. **Principio del método de ensayo**

Se ponen juntos, en un recipiente de vidrio de 1 a 4 litros de capacidad y equipado con un mezclador y un aireador, lodo activado, nutrientes minerales y el material del ensayo como unica fuente de carbon en solucion acuosa. Se remueve y se airea la mezcla a 20-25° C, bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro por un periodo de hasta 28 dias. El proceso de degradacion se controla por medio de la determinación de los valores de COD (o DQO) en la solución filtrada a intervalos diarios o a intervalos regulares que resulten apropiados. La relacion entre la cantidad de COD (DQO) eliminada tras cada intervalo y el valor 3 horas después del comienzo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradación y sirve de medida del alcance de la degradación en ese momento.

El resultado se indica en un gráfico en función del tiempo para obtener asi la curva de biodegradacion.

Cuando se utiliza un metodo analitico especifico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molecula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

1.5. **Criterios de calidad**

Ha quedado demostrado que la reproducibilidad de esta prueba es satisfactoria en una prueba en varios centros.

La sensibilidad de este método viene determinada en gran medida por la variabilidad del blanco y, en menor medida, por la precision de la determinacion del carbon organico disuelto y el nivel del compuesto del ensayo en la mezcla líquida.

1.6. **Descripción del procedimiento del ensayo**

1.6.1. *Preparativos*

1.6.1.1. **Reactivos**

— Agua de ensayo: agua potable con un cotenido de carbón organico menor de 5 mg/l. La concentración de iones de calcio y magnesio juntos no puede exceder los 2,7 mmoles/l; de otra manera, es necesaria una dilución suficiente con agua desionizada o destilada.

— Acido sulfúrico, reactivo analítico (R.A.): 50 g/l

— Solución de hidróxido de sodio R.A.: 40 g/l

— Solución de nutriente mineral: disuelvase en un litro de agua desionizada:

cloruro de amonio, NH_4Cl, R.A.:	38,5 g
dihidrogeno fosfato de sodio, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, R.A.:	33,4 g
dihidrógeno fosfato de potasio, KH_2PO_4, R.A.:	8,5 g
monohidrogeno fosfato de dipotasio, K_2HPO_4, R.A.:	21,75 g.

La mezcla sirve a la vez de elemento nutritivo y de sistema tampon.

1.6.1.2. **Aparatos**

— recipientes de vidrio de un volumen de 1 a 4 litros (p. ej., recipientes cilindricos)

— mezclador con un agitador de vidrio o metal colocado en un eje apropiado. (El agitador debe girar a 5-10 cm por encima del fondo del recipiente). Se puede utilizar en su lugar un agitador magnetico con una varilla de 7-10 cm de larga

— un tubo de vidrio de 2 a 4 mm de diametro interior para introducir aire. La abertura del tubo debe estar a, más o menos, 1 cm por encima del fondo del recipiente

— una centrifuga (unos 3 550 g)

— un medidor de pH

— un medidor de oxigeno disuelto

— filtros de papel

— un aparato de filtracion por membrana

— filtros de membrana, tamaño de los poros 0,45 µm. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbon ni absorben la sustancia en la fase de filtración

— un equipo analitico para determinar el contenido de carbon organico y la demanda quimica de oxigeno.

1.6.1.3. **Preparación del inóculo**

Se lava (repetidamente) el lodo activado recogido en una planta de tratamiento biológico, centrifugándolo o dejándolo sedimentarse con agua de iguales caracteristicas a la que se usa para el ensayo (antes citado).

El lodo activado tiene que estar en condiciones adecuadas. Este fango puede encontrarse en una planta depuradora de aguas residuales que funcione debidamente. Para coger tantas especies o cepas de bacterias diferentes como sea posible, puede ser preferible mezclar inóculos de diferentes fuentes (p. ej. diferentes plantas depuradoras, extractos de suelos, aguas de no, etc.). La mezcla debe ser tratada como se describe anteriormente.

Para comprobar la actividad del lodo activado, vease «Control funcional».

1.6.1.4. **Preparación de las soluciones del ensayo**

Pónganse, en el recipiente que se unliza para el ensayo, 500 ml de agua de ensayo, 2,5 ml/l de una solución de nutrientes minerales y lodo activado en una cantidad equivalente a 0,2 a 1,0 g/l de materia seca en la mezcla final. Añádase suficiente solución madre de la sustancia a ensayar como para que en la mezcla final se obtenga una concentración de COD de 50 a 400 mg/l. Los valores correspondientes de DQO son 100-1 000 mg/l. Añádase agua de ensayo hasta llegar a un volumen total de 1 a 4 litros. El volumen total que se elija dependerá del número de muestras que se vayan a tomar para las determinaciones del COD y DQO y las cantidades necesarias para el procedimiento analítico. Normalmente, puede considerarse satisfactorio un volumen de 2 litros.

Se dispone por lo menos un recipiente de control (blanco), paralelamente a cada una de las series de ensayo, que contenga tan sólo una solución de lodo activado y la solución de nutrientes minerales, que se completara con agua de ensayo hasta alcanzar un volumen total igual al de los recipientes de ensayo.

1.6.2. *Realización del ensayo*

Se agitan los recipientes del ensayo con agitadores magneticos o hélices bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro a 20-25° C. La aireación se efectua con aire comprimido limpiado por medio de un filtro de algodón y lana y un frasco lavador si fuera necesario. Hay que asegurarse de que el lodo no sedimenta y de que la concentración de oxigeno no cae por debajo de los 2 mg/l.

Hay que controlar el pH a intervalos regulares (por ejemplo cada dia) y, si fuera necesario, corregirlo ajustándolo a 7-8.

Las pérdidas por evaporación se compensan, justo antes de tomar cada muestra, con agua desionizada o destilada en las cantidades necesarias. Un buen procedimiento es marcar el nivel del líquido sobre el recipiente antes de iniciar el ensayo. Se hacan marcas nuevas después de cada toma (sin aireación y sin remover). Las primeras muestras se toman siempre 3 horas después del comienzo del ensayo, para detectar la absorción del material de ensayo por parte del lodo activado.

La eliminación del material de ensayo se controla por medio de las determinaciones de COD y DQO hechas diariamente o a intervalos regulares. Las muestras del recipiente utilizado para el ensayo y del recipiente de control son filtradas con un filtro de papel cuidadosamente lavado. Se desechan los primeros 5 ml de la solución filtrada. Los lodos difíciles de filtrar pueden ser separados previamente centrifugándolos durante 10 minutos. Las determinaciones de COD y DQO deben hacerse por lo menos por duplicado. El ensayo se lleva a cabo durante un período de hasta 28 dias.

Nota: Las muestras que todavia esten turbias son filtradas con filtros de membrana. Los filtros de membrana no han de desprender ni absorber material orgánico alguno.

Control funcional del lodo activado

En un recipiente que contenga una sustancia conocida deben llevarse a cabo paralelamente cada serie de pruebas, con vistas a controlar la capacidad funcional del lodo activado. Se ha comprobado que el dietilenoglicol es de utilidad para este propósito.

Adaptación

Si los análisis se llevan a cabo a intervalos relativamente cortos (p. ej., diariamente), se puede reconocer claramente la adaptación por medio de la curva de degradación (vease la Figura 2). Así pues, el ensayo no debe iniciarse justo antes del fin de semana.

Si la adaptación tiene lugar al final del período, el ensayo puede prolongarse hasta que finalice la degradación.

Nota: Si fuera necesario un conocimiento más amplio del comportamiento del lodo adaptado, se expone de nuevo el mismo lodo activado al mismo material del ensayo, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Desconéctense el agitador y el aireador y permitase que el lodo activado se sedimente. Vacíese el líquido sobrenadante, añádase agua de ensayo hasta alcanzar los 2 litros, agítese durante 15 minutos y déjese sedimentar de nuevo. Después de haber vaciado de nuevo el líquido sobrenadante, utilícese el lodo que queda para repetir el ensayo con el mismo material, de acuerdo con los puntos 1.6.1.4 y 1.6.2. Se puede aislar el lodo activado centrifugando en vez de dejándolo sedimentar.

El lodo adaptado puede mezclarse con lodo fresco hasta alcanzar un total de 0,2 a 1 g de peso en seco, por litro.

Medios analíticos

Normalmente, se filtran las muestras con un filtro de papel cuidadosamente lavado (para lavarlo, utilícese agua desionizada).

Las muestras que sigan estando turbias se filtrarán con filtros de membrana (0,45 µm).

La concentración de COD se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado (se desechan los primeros 5 ml) por medio del instrumento TOC. Si el líquido filtrado no puede ser analizado el mismo día, tiene que almacenarse en el refrigerador hasta el día siguiente. No se recomienda un almacenaje más prolongado.

La concentración de DQO se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado con un sistema analítico siguiendo el procedimiento descrito en la referencia bibliográfica 2 posterior.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

Las concentraciones de COD y DQO se determinan en las muestras, por lo menos por duplicado, de acuerdo con el punto 1.6.2. La degradación en el tiempo T se calcula según la fórmula (con definiciones) dada en el punto 1.2.

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana. La cantidad de degradación lograda al final del ensayo se presenta como la «biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens».

Nota: Si se logra una degradación completa antes de que termine el periodo de duración del ensayo y si este resultado es confirmado por un segundo análisis al día siguiente, el ensayo puede darse por concluido.

3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

3.1. Informe sobre el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— la concentración inicial de la sustancia

— cualquier otra información y los resultados experimentales relativos a la sustancia objeto del ensayo, a la sustancia de referencia, si se utiliza alguna, y al control

— la concentración después de tres horas

— la curva de biodegradación con una descripción

— fecha y lugar en que se tomaron las muestras de los organismos utilizados en el ensayo, status de adaptación, concentración utilizada, etc.

— causas científicas de cualquier cambio en el procedimiento del ensayo.

3.2. Interpretación de los resultados

La eliminación de COD (o DQO) que tiene lugar gradualmente, durante días o semanas, indica que la sustancia objeto del ensayo se está biodegradando.

No obstante, la absorción físico-química puede, en algunos casos, desempeñar un papel, y esto se pone de manifiesto cuando hay una eliminación completa o parcial desde el principio, dentro de las tres primeras horas, y la diferencia entre las mezclas líquidas sobrenadantes del control y del ensayo se mantienen a un nivel inesperadamente bajo.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una diferencia entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero lo más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de base fija (una prueba respirométrica preferentemente).

Las sustancias que en este ensayo den una eliminación de COD (o DQO) alta, y no debida a la absorción, deben ser consideradas como potencialmente biodegradables. Una eliminación parcial y no debida a la absorción indica que el producto químico puede sufrir al menos cierta biodegradación.

Una eliminación baja o nula de COD (o DQO) puede deberse a que la sustancia objeto del ensayo provoca la inhibición de los microorganismos. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida del lodo, produciendo sobrenadantes turbios. Se debe repetir el ensayo utilizando una concentración inferior de la sustancia objeto de estudio.

La utilización de un método analítico específico para el compuesto, o de una sustancia del ensayo marcada con ^{14}C, puede permitir una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de ensayo marcado con ^{14}C la obtención de $^{14}CO_2$ confirmará que se ha producido biodegradación.

Cuando los resultados se presenten en términos de biodegradación primaria, se debe dar, si fuera posible, una explicación sobre el cambio de estructura química que lleva a la pérdida de respuesta de la sustancia madre utilizada en el ensayo.

La validación del método analítico tiene que presentarse junto con la respuesta encontrada con el medio de ensayo control (blanco).

4. REFERENCIAS

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 B*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) Anexo V C.9 Degradación: Demanda química de oxígeno, Directiva 84/449/CEE de la Comisión, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* N° L 251 de 19. 9. 1984.

Anexo

EJEMPLO DE EVALUACIÓN

Compuesto orgánico: ácido 4-Etoxibenzoico
Concentración teórica de ensayo: 600 mg/l
COD teórico: 390 mg/l

Inóculo: planta depuradora de aguas residuales . . .
Concentración: 1 g de material seco/litro
Status de adaptación: no adaptado

Análisis: determinación de COD

Cantidad de muestra: 3 ml

Sustancia de control: dietilenglicol

Toxicidad del compuesto: sin efectos tóxicos por debajo de los 1 000 mg/l.
Ensayo utilizado: Ensayo de fermentación con tubos.

Tiempo de ensayo	Sustancia de control				Sustancia de ensayo		
	COD (1) del control mg/l	COD (1) mg/l	COD neto mg/l	Degradacion (%)	COD (1) mg/l	COD neto mg/l	Degradacion (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 h	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 d	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 d	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 d	6,3	270,6	264,2	12	193,8	187,5	52
6 d	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 d	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 d	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 d	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 d	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valores medios de determinaciones por triplicado.

Figura 1

Ejemplos de curvas de biodegradación

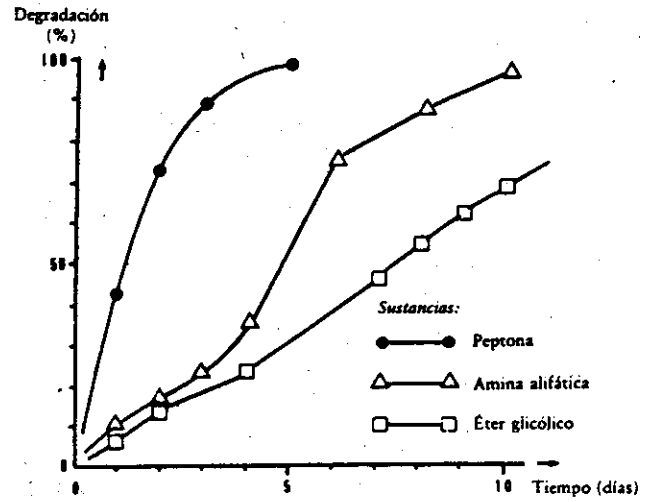
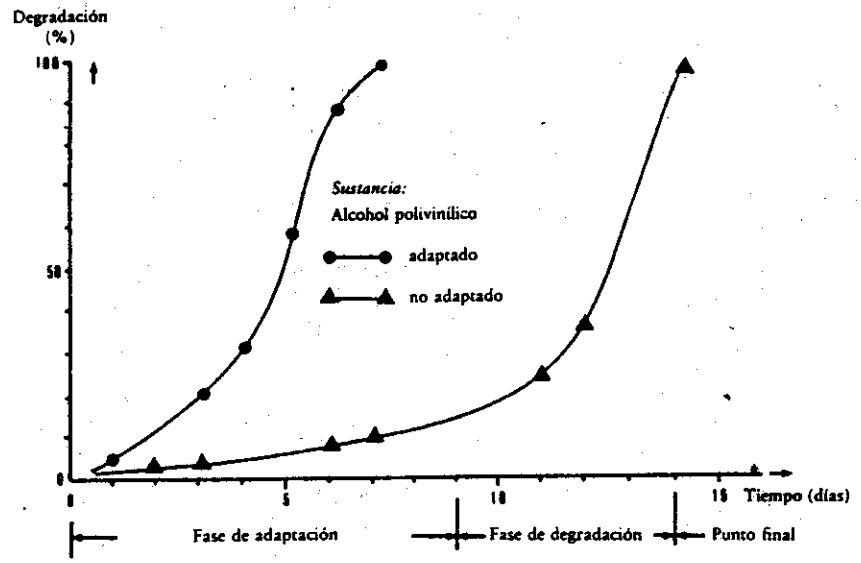


Figura 2

Ejemplos de adaptación del lodo



BIODEGRADACIÓN

C.9. ENSAYO DE SIMULACIÓN CON LODO ACTIVADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

1.1.1. *Comentarios generales*

Este método sólo es aplicable a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

— sean tan solubles en agua como sea necesario para la preparación de las soluciones de ensayo

— sometidas a las condiciones del ensayo, tengan una presión de vapor insignificante

— no provoquen inhibición en las bacterias.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material de ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

1.1.2. *Determinación de la biodegradabilidad máxima (análisis del COD/DQO)*

El objeto de este método es determinar la biodegradabilidad máxima a través de la medición de la eliminación de la sustancia y de cualquier metabolito en un modelo de planta de lodo activado con una concentración equivalente a > 12 mg de COD/l (o aproximadamente 40 mg de DQO/l). 20 mg de COD/l parece ser la óptima.

(COD = carbón orgánico disuelto por litro, DQO = demanda química de oxígeno). El contenido de carbón orgánico (o la demanda química de oxígeno) del material de ensayo tiene que ser determinado.

1.1.3. *Determinación de la biodegradabilidad primaria (análisis específico)*

El objeto del método es determinar la biodegradabilidad primaria de una sustancia en un modelo de planta de lodo activado, con una concentración de unos 20 mg/l, por medio de un método analítico específico (se puede utilizar una concentración superior o inferior si el método analítico y su toxicidad lo permiten). Esto permite la valoración de la biodegradabilidad primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El objeto de este método *no* es la determinación de la mineralización de la sustancia ensayada.

Se tiene que contar con un método analítico adecuado para la determinación de la sustancia.

1.2. Definiciones y unidades

1.2.1. *Análisis del COD/DQO*

El grado de eliminación de la sustancia viene dado por:

$$GE = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\% \qquad [1\ a)]$$

donde:

GE = grado de eliminación en porcentaje de COD (o DQO) dentro del tiempo de retención medio dado con respecto al material de ensayo

T = concentración del material de ensayo en el afluente en mg de COD/litro (o mg de DQO/litro)

E = concentración de COD (o DQO) en el efluente de la unidad de ensayo en mg de COD/litro (o DQP/litro)

E_o = concentración de COD (o DQO) en el efluente del blanco en mg de COD/litro (o DQO/litro).

La degradación se expresa, como la eliminación, en porcentaje de COD (o DQO) dentro del tiempo de retención dado con respecto al material de ensayo.

1.2.2. *Análisis específico*

La eliminación porcentual de la sustancia ensayada de su fase acuosa (R_a) dentro del tiempo medio de retención dado viene dada por:

$$R_a = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\% \qquad [1\ b)]$$

donde:

C_I = concentración de la sustancia en el afluente de la unidad en la que se realiza el ensayo (mg de sustancia por litro, determinada por medio de un análisis específico)

C_O = concentración de la sustancia en el efluente de la unidad en la que se realiza el ensayo (mg de sustancia por litro, determinada por medio de un análisis específico).

1.3. Sustancias de referencia

En algunos casos, cuando se está investigando una sustancia nueva, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no pueden recomendarse sustancias de referencia específicas.

1.4. Principios de los métodos de ensayo

Para determinar la biodegradabilidad máxima, se organizan paralelamente dos unidades piloto de lodo activado (unidades de ensayo confirmatorio OCDE o de depósito poroso). Se vierte la sustancia objeto del ensayo en el afluente (aguas residuales domésticas o sintéticas) de una de las unidades, mientras que la otra recibe tan sólo aguas residuales. Para la determinación de la biodegradación primaria con un análisis específico en el afluente y el efluente, sólo se utiliza una unidad.

Las concentraciones de COD (o DQO) se miden en los efluentes, o se determinan las concentraciones de sustancia por medio de un análisis específico.

El COD debido al material del ensayo no es medido sino simplemente especificado.

Cuando se realizan las mediciones de COG (o DQO), se supone que las diferencias entre las concentraciones medias de los efluentes del ensayo y del control se deben a material del ensayo no degradado.

Cuando se realizan análisis específicos, se pueden medir los cambios en la concentración de la molécula madre (biodegradación primaria).

Las unidades pueden manejarse siguiendo el «método de unidades acopladas», por medio de un procedimiento de transinoculación.

1.5. Criterios de calidad

La concentración inicial de la sustancia depende del tipo de análisis que se vaya a realizar y su limitación.

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. *Preparación*

1.6.1.1. Aparatos

Se necesitan un par de unidades del mismo tipo, excepto cuando se realizan análisis específicos. Se pueden utilizar dos tipos de dispositivos:

La prueba confirmatoria OCDE:

El equipo (Anexo I) consiste en un recipiente de almacenaje (A) para las aguas residuales sintéticas, una bomba de dosificación (B), un recipiente de aireación (C), un separador (D), una bomba de aire (E) para reciclar el lodo activado y un recipiente (F) para recoger el efluente tratado.

Los recipientes (A) y (F) tienen que ser de vidrio o de un plástico apropiado y deben tener una capacidad de 24 litros por los menos. La bomba (B) tiene que proporcionar una corriente constante de aguas residuales sintéticas en el recipiente de aireación; se puede usar cualquier sistema conveniente, con tal que la corriente de entrada y la concentración queden aseguradas.

Durante el funcionamiento normal, se fija la altura del separador de modo que el volumen contenido en el recipiente de aireación sea de 3 litros de mezcla líquida. Se cuelga en el recipiente (C), en el vértice del cono, un cubo de aireación sintetizado (G). La cantidad de aire soplado a través del aireador puede controlarse por medio de un contador de corriente.

La bomba de aire (E) se coloca de manera que el lodo activado del separador sea continua y regularmente reciclado en el recipiente de aireación (C).

El depósito poroso:

El depósito poroso está construido a base de láminas de polietileno poroso (2 mm de espesor, tamaño máximo de los poros 95 µm), que adoptan la forma de cilindros de 14 cm de diámetro con una base cónica a 45° (Figuras 1 y 2 del Anexo II). El depósito poroso se encuentra en el interior de un recipiente impermeable, hecho de un plástico conveniente, de 15 cm de diámetro y con una salida a una altura de 17,2 cm en la parte cilíndrica, que determina el volumen (3 l) en el depósito. Hay un anillo rígido de soporte, hecho de un plástico conveniente, alrededor de la parte superior del recipiente interior, de modo que hay un espacio de 0,5 cm para el efluente entre el recipiente interior y el exterior.

Los depósitos porosos pueden montarse en la base de un baño maría termostáticamente regulado. Se suministra aire en la base del recipiente interior, en el que se colocan unos difusores apropiados.

Los recipientes (A) y (E) tienen que ser de vidrio o de un plástico conveniente y deben tener una capacidad de 24 litros por lo menos. La bomba (B) tiene que proporcionar una corriente constante de aguas residuales sintéticas al recipiente de aireación; puede usarse cualquier sistema apropiado, con tal que se asegure la corriente de entrada y la concentración.

Se necesitan depósitos porosos interiores de recambio para reemplazar a los que puedan bloquearse; los depósitos bloqueados se limpian por medio de una inmersión de 24 horas en una solución de hipoclorito seguida de un minucioso lavado con agua del grifo.

1.6.1.2. Filtración

Aparatos de filtración por membrana y filtros de membrana con poros de un tamaño de 0,45 µm. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración.

1.6.1.3. Aguas residuales

Se puede usar tanto afluente sintético apropiado como aguas residuales domésticas.

Ejemplo de afluente sintético:

disuélvase en cada litro de agua del grifo:

peptona	160 mg
extracto de carne	110 mg
urea	30 mg
NaCl	7 mg
$CaCl_2.2H_2O$	4 mg
$MgSO_4.7H_2O$	2 mg
K_2HPO_4	28 mg.

Aguas residuales domésticas:

Deben recogerse frescas cada día en una cañería de desagüe de un tanque de sedimentación primaria de una planta de tratamiento que trate aguas residuales domésticas predominantemente.

1.6.1.4. Solución madre del material del ensayo

Debe prepararse una solución del material del ensayo (p. ej. 1 %) para ser añadida a la unidad en que se realiza el ensayo. La concentración del material tiene que determinarse, de modo que se conozca el volumen apropiado que hay que añadir a las aguas residuales o directamente a la unidad por medio de una segunda bomba, para obtener la concentración necesaria para el ensayo.

1.6.1.5. Inóculo

Nota: Cuando se utilizan aguas residuales domésticas, no vale la pena utilizar un inóculo de baja concentración bacterial, sino que se puede utilizar lodo activado.

Pueden utilizarse diversos inóculos.

Tres ejemplos de inóculos apropiados son:

a) Inóculo procedente de un efluente secundario:

El inóculo debe obtenerse a partir de un efluente secundario de buena calidad recogido en una planta de tratamiento que trate predominantemente aguas residuales domésticas. Hay que mantener el efluente en condiciones aeróbicas durante el tiempo que va desde la recogida de las muestras hasta su uso. Para preparar el inóculo, se filtra la muestra en un filtro poco fino y se desechan los primeros 200 ml. El líquido así filtrado es mantenido en condiciones aeróbicas hasta su uso. El inóculo tiene que ser usado el mismo día que es recogido. Se deben usar por lo menos 3 ml para la inoculación.

b) Inóculo compuesto:

Inóculo procedente de un efluente secundario:

Véase la descripción anterior.

Inóculo procedente de suelo:

Se suspenden 100 g de suelo de jardín (fértil, no estéril) en 1 000 ml de agua potable sin cloro (Los suelos con una proporción extremadamente elevada de arcilla, arena o humus son inadecuados). Tras agitar la mezcla, se deja que la suspensión se deposite durante 30 minutos. Se filtra el sobrenadante con un filtro de papel poco fino y se desechan los primeros 200 ml. Se airea el líquido filtrado inmediatamente y hasta su uso. El inóculo tiene que usarse el mismo día en que es recogido.

Inóculo precedente de aguas superficiales:

Un tercer inóculo parcial se obtiene de aguas superficiales mesosapróbicas. La muestra se filtra con un papel poco fino y se desechan los primeros 200 ml. El líquido así filtrado es mantenido en condiciones aeróbicas hasta su uso. El inóculo tiene que usarse el mismo día en que es recogido.

Se reúnen y mezclan bien volúmenes iguales de las 3 muestras parciales de inóculo y se extrae de esta mezcla la muestra final. Deben usarse por lo menos 3 ml para la inoculación.

c) Inóculo procedente de lodo activado:

Se puede usar como inóculo un volumen (no más de 3 litros) de lodo activado (contenido de sólidos en suspensión de hasta 2,5 g/l) sacado del tanque de aireación de una planta que trate predominantemente aguas residuales domésticas.

1.6.2. *Procedimiento*

El ensayo se realiza a temperatura ambiental; ésta debe mantenerse entre los 18 y los 25° C.

Si fuera apropiado, el ensayo puede realizarse a una temperatura inferior (de hasta 10° C): si la sustancia se degrada, entonces no es necesario ningún trabajo más. Si, sin embargo, la sustancia no se degrada, el ensayo debe llevarse a cabo a una temperatura constante entre los 18° y los 25° C.

1.6.2.1. Período de rodaje: Formación/estabilización del lodo de las unidades

El período de crecimiento/estabilización del lodo activado es el período durante el cual la concentración de los sólidos en suspensión del lodo activado y el funcionamiento de las unidades, progresan hasta llegar a un estado constante en las condiciones de explotación empleadas.

El período de rodaje es el período que va desde el momento en que la sustancia objeto de ensayo es añadida por primera vez hasta el momento en que su eliminación alcanza un trazado constante (valor relativamente constante). Este período no tiene que sobrepasar las seis semanas.

El período de evaluación es un período de tres semanas, tres semanas desde el momento en que la eliminación de la sustancia alcanza un valor relativamente constante, generalmente alto. Para aquellas sustancias que muestran escasa o nula degradación durante las primeras seis semanas, las tres semanas siguientes se consideran como el período de evaluación.

Al principio, lléne(n)se la(s) unidad(es) necesaria(s) para un ensayo con el inóculo mezclado con afluente.

Entonces se ponen en funcionamiento el aireador (y la bomba de aireación [E] en el caso de tener unidades de prueba confirmatoria OCDE) y el mecanismo de administración (B).

El afluente sin la sustancia tiene que pasar a través del recipiente de aireación (C) bien a la velocidad de un litro por hora, bien a la velocidad constante de medio litro por hora; esto da un tiempo medio de retención de tres o seis horas respectivamente.

La velocidad de aireación debe regularse de modo que el contenido del recipiente (C) se mantenga constantemente en suspensión, mientras el contenido de oxígeno disuelto es por lo menos de 2 mg/l.

Hay que evitar la formación de espuma de una manera apropiada. No hay que usar agentes antiespuma que inhiban el lodo activado.

El fango que se acumula alrededor de la parte superior del recipiente de aireación (C), (y, en el caso de las unidades de prueba confirmatoria OCDE, en la base del recipiente de sedimentación [D] y en el circuito de circulación) debe ser devuelto a la mezcla líquida al menos una vez al día rascando con un cepillo o de cualquier otro modo que resulte apropiado.

Cuando el fango no se sedimenta, puede aumentarse su densidad añadiendo porciones de 2 ml de una solución al 5 % de cloruro de hierro; repítase si fuera necesario.

El efluente se acumula en un recipiente (E o F) durante 20 a 24 horas, y se toma una muestra después de mezclarlo concienzudamente. Hay que limpiar el recipiente (E o F) cuidadosamente.

A fin de supervisar y controlar la eficiencia del proceso, se mide por lo menos dos veces a la semana la demanda química de oxígeno (DQO) o el carbón orgánico disuelto (COD) del líquido filtrado a partir del efluente acumulado, así como la del líquido filtrado a partir del efluente (utilizando una membrana de poros de tamaño 0,45 µm). Los primeros 20 ml (aproximadamente) del líquido filtrado se desechan.

La reducción del DQO o COD debe estabilizarse cuando se obtiene una degradación diaria más o menos regular.

El contenido de materia seca del lodo activado que está en el tanque de aireación debe determinarse dos veces a la semana (en g/l). Las unidades pueden operarse de dos maneras: bien se determina el contenido de materia seca del lodo activado dos veces a la semana y, si éste es superior a 2,5 g/l, se desecha el exceso de lodo activado; o bien se retiran cada día 500 ml de mezcla líquida, de cada depósito, para conseguir un tiempo medio de retención de seis días.

Cuando los parámentros [eficiencia del proceso (eliminación de DQO o COD), concentración del lodo, sedimentabilidad del lodo, turbidez de los efluentes, etc . . .] medidos y calculados de las dos unidades, son suficientemente constantes, se puede introducir la sustancia objeto de ensayo en el afluente de una de las dos unidades (como se indica en 1.6.2.2).

Por otra parte, la sustancia puede asimismo añadirse al principio del período de crecimiento del lodo (1.6.2.1) especialmente cuando el lodo es añadido en tanto que inóculo.

1.6.2.2. Procedimiento de ensayo

Se mantienen las condiciones de explotación del período de rodaje y se añade la suficiente cantidad de solución madre (aproximadamente el 1 %) del material de ensayo afluente de la unidad en que se realiza el mismo, de modo que se obtenga la concentración deseada del material en las aguas residuales (aproximadamente 10 ó 20 mg de COD/l o 40 mg de DQO/l). Esto se puede lograr mezclando la solución de reserva con las aguas residuales diariamente o por medio de un sistema de bombeo separado. Esta concentración puede alcanzarse progresivamente. Si la sustancia objeto de ensayo no tiene efectos tóxicos sobre el lodo activado, se pueden probar concentraciones superiores.

Se alimenta el blanco sólo con afluente sin sustancias añadidas. Se toman para su análisis volúmenes suficientes de efluentes y se filtran con filtros de membrana (0,45 µm). Se desechan los primeros 20 ml (aproximadamente).

Las muestras filtradas tienen que analizarse el mismo día, si no, hay que preservarlas por medio de un método apropiado, por ejemplo, usando 0,05 ml de una solución de cloruro de mercurio al 1 % por cada 10 ml de líquido filtrado o almacenándolas a 2 ó 4° C hasta 24 horas, o por debajo de los —18° C para períodos más largos.

El período de rodaje, con la adición de la sustancia a ensayar, no debe exceder las seis semanas y el período de evaluación no debe ser inferior a tres semanas, esto es, debe haber disponibles unas 14 ó 20 determinaciones para calcular el resultado final.

Método de unidades acopladas:

El acoplamiento de las unidades se consigue intercambiando 1,5 litros de mezcla líquida (incluido el lodo) de los recipientes de aireación del lodo activado entre las dos unidades una vez al día. Cuando los materiales de ensayo son fuertemente absorbentes, se sacan sólo 1,5 litros de líquido sobrenadante de los recipientes de sedimentación y se vierten en el recipiente de lodo activado de la otra unidad.

1.6.2.3. Análisis

Se pueden realizar dos tipos de análisis para examinar el comportamiento de la sustancia:

COD y DQO:

Las concentraciones de COD se realizan por duplicado con el analizador de carbón y/o los valores de DQO según la referencia bibliográfica 2.

Análisis específico:

Las concentraciones de la sustancia en estudio se determinan por medio de un método analítico apropiado. Cuando sea posible, se debe llevar a cabo la determinación específica de la sustancia absorbida en el lodo.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

2.1. Método de unidades acopladas

Cuando se utiliza el «método de unidades acopladas», los grados de eliminación diaria GE % se calculan de acuerdo con 1.2.1.

Estos grados de eliminación diaria GE son corregidos con la ecuación [2] para un tiempo medio de retención de tres horas y la ecuación [3] para seis horas, dando GEc para la transferencia de material debida al procedimiento de transinoculación.

$$GEc = \frac{8}{7}\,GE - \frac{100}{7} \qquad [2]$$

$$GEc = \frac{4}{3}\,GE - \frac{100}{3} \qquad [3].$$

Se calcula la media de la serie de valores de GEc, así como la desviación estándar de acuerdo con la ecuación [4]:

$$s_{GEc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{GEc} - GEc_i)^2}{n-1}} \qquad [4]$$

donde:

s_{GEc} = Desviación estándar de la serie de valores de GEc

s_{GEc} = media de los valores de GEc

n = número de determinaciones.

Los valores atípicos de la serie de GEc se eliminan conforme a un procedimiento estadístico adecuado, p. ej. Nalimov (referencia 6), al nivel de probabilidad del 95 %, y se vuelven a calcular la media y la desviación estándar de la serie de valores de DRc una vez libre de valores atípicos.

El resultado final se calcula entonces con la ecuación [5]:

$$GEc = \overline{GEc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}}\, s_{GEc} \qquad [5]$$

donde:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabular de t para n pares E y E_O, y fiabilidad estadística P (P = 1 − α), según la cual P se fija en un 95 % (referencia 1).

El resultado se expresa dando la media con límites de tolerancia al nivel de probabilidad del 95 %, la respectiva desviación estándar y el número de valores de la serie DRc, una vez libre de valores atípicos, así como el número de éstos, p. ej.:

GEc = 98,6 ± 2,3 % de eliminación de COD

s = 4,65 % de eliminación de COD

n = 18

x = número de valores atípicos.

2.2. Modo de unidades no acopladas

El funcionamiento de las unidades puede controlarse como sigue:

$$\text{porcentaje de eliminación de DQO o COD} = \frac{\text{DQO o DOC de las aguas residuales} - \text{DQO o DOC del efluente}}{\text{DQO o COD de las aguas residuales}} \times 100$$

Estas eliminaciones diarias pueden trazarse gráficamente para revelar las tendencias, p. ej. a una aclimatación.

2.2.1. *Cómo utilizar las determinaciones de DQO/COD*

El grado diario de eliminación GE % se calcula según 1.2.1.

Se calcula la media de la serie de valores de GE, así como la desviación estándard de acuerdo con:

$$s_{GE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{GE} - GE_i)^2}{n-1}} \qquad [6]$$

donde:

s_{GE} = Desviación estándar de la serie de valores de GE_i

$\overline{GE}$ = Media de los valores de GE_i

n = Número de determinaciones.

Los valores atípicos de la serie de GE se eliminan conforme a un procedimiento estadístico adecuado, p. ej. Nalimov (referencia 6), al nivel de probabilidad del 95 %, y se vuelven a calcular la media y la desviación estándar de la serie de los valores de GE una vez libre de valores atípicos.

El resultado final se calcula entonces con la ecuación [7]:

$$GE = \overline{GE} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{GE} \qquad [7]$$

donde:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabular de t para n pares de valores de E y E_O y fiabilidad estadística P ($P = 1 - \alpha$) según la cual P se fija en un 95 % (referencia 1).

El resultado se expresa dando la media con límites de tolerancia al nivel de probabilidad del 95 %, la respectiva desviación estándar, y el número de valores de la serie GE una vez libre de valores atípicos, así como el número de éstos, p. ej.:

GE = (98,6 ± 2,3 %) de eliminación de COD

s = 4,65 % de eliminación de COD

n = 18

x = número de valores atípicos.

2.2.2. *Cómo utilizar un análisis específico*

El porcentaje de eliminación de la sustancia objeto de estudio en la fase acuosa (R_a) se calcula de acuerdo con 1.2.2.

3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

3.1. Informe sobre el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— el formulario del Anexo III, indicando las condiciones de funcionamiento del ensayo

— qué aparato se eligió (prueba confirmatoria OCDE o depósito poroso)

— qué método se ha elegido: método de unidades acopladas o no

— qué aguas residuales: sintéticas o domésticas. En caso de que sean aguas residuales domésticas, fecha y lugar de la muestra

— qué inóculo, con fecha y lugar de la muestra

— una descripción del método analítico si se realizaron análisis específicos

— gráfico de la eliminación de DQO o COD en función del tiempo, incluyendo el período de rodaje y de evaluación

— recuperación analítica de la sustancia en estudio en forma de DQO o COD en la solución madre

— si se realizaron análisis específicos, gráfico del porcentaje de la eliminación de la sustancia de la fase acuosa en función del tiempo (período de rodaje y de evaluación)

— la media de eliminación de COD, DQO o de la sustancia y la desviación estándar se calculan a partir de los resultados del período de evaluación, es decir, cuando hay una eliminación constante de material del ensayo o un período de funcionamiento constante

— gráfico de la concentración de lodo activado en función del tiempo

— cualquier observación sobre el lodo activado (exceso de lodo desechado, presencia de aglomeraciones, $FeCl_3$, . . .)

— concentración de la sustancia utilizada en el ensayo

— cualquier resultado sobre análisis realizados en el lodo

— toda la información y todos los resultados experimentales sobre la sustancia en estudio y la sustancia de referencia, si se utilizó alguna

— causas científicas de cualquier cambio de procedimiento.

3.2. Interpretación de los resultados

Una baja eliminación de la sustancia de estudio en la fase acuosa puede deberse a una inhibición de los microorganismos por parte de la sustancia. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida de lodo, produciendo un sobrenadante turbio, y a través de una reducción de la eficiencia en la eliminación de DQO (o COD) de la planta piloto.

La absorción físico-química puede desempeñar a veces un papel. Los análisis realizados en el lodo tras una adecuada desorción pueden revelar diferencias entre la acción biológica de la molécula y la absorción físico-química.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una distinción entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero la más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de grupo base (una prueba respirométrica preferentemente).

Si se observan eliminaciones elevadas de COD o DQO, entonces ello es debido a la biodegradación, mientras que, en el caso de eliminaciones reducidas, la biodegradación no se puede distinguir de la eliminación, p. ej., si un compuesto soluble da muestras de una absorción constante del 98 % y la proporción de excedente de fango retirado es del 10 % diario, una eliminación de hasta el 40 % es posible; con una proporción de excedente de lodo retirado del 30 %, la eliminación debida a la absorción y a la retirada con excedente de lodo puede llegar a ser del 65 % (referencia 4).

Cuando se utilicen análisis específicos, se debe prestar atención a la relación entre la estructura de la sustancia y el análisis específico empleado. En este caso, el fenómeno observado no puede ser interpretado como una mineralización de la sustancia.

4. REFERENCIAS

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 303 A*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) Anexo V C 9 Prueba de degradación — Demanda de oxígeno químico. Directiva 84/449/CEE de la Comisión (*Diario Oficial de las Commidades Europeas* nº L 251 de 19. 9. 1984).

(3) Painter, H. A. y King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center Reino Unido.

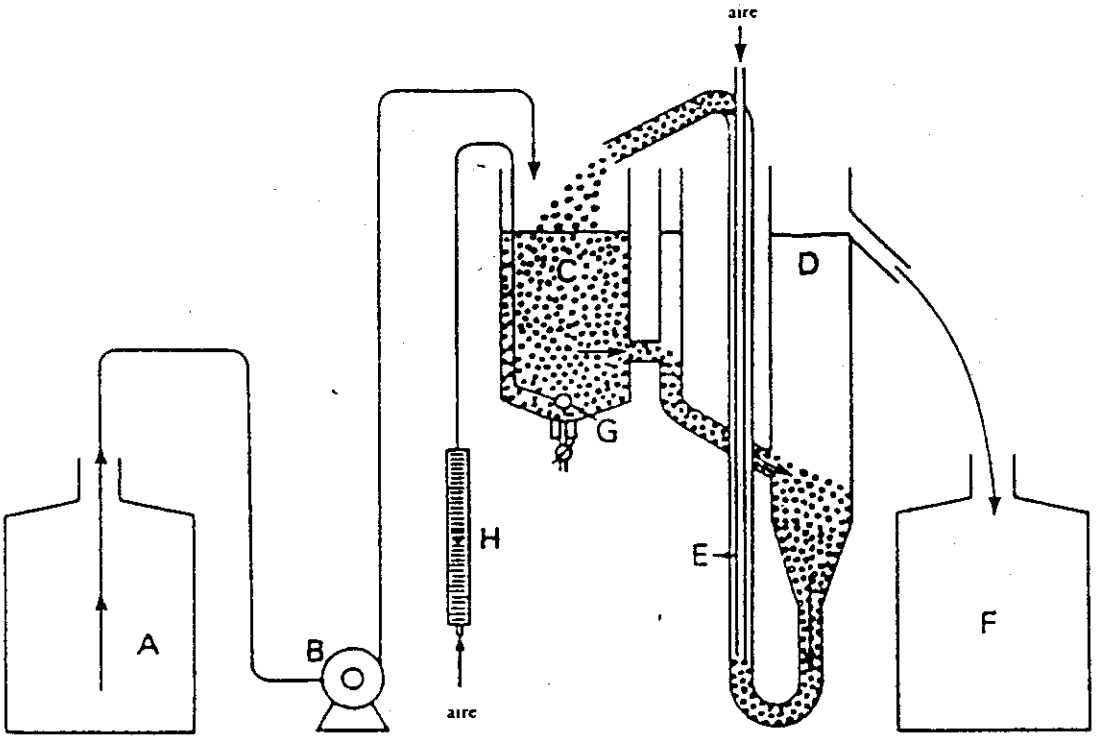
(4) Wierich, P. and Gerike, P., — «The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants» — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, nº 2. June 1981, p. 161a, 171.

(5) Directivas 82/242/CEE y 82/243/CEE del Consejo (*Diario Oficial de las Commidades Europeas* nº L 109 de 22. 4. 1982), corrigiendo las Directivas 73/404/CEE y 73/405/CEE: Biodegradabilidad de los detergentes (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 347 de 17. 12. 1973).

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980) 406-408.

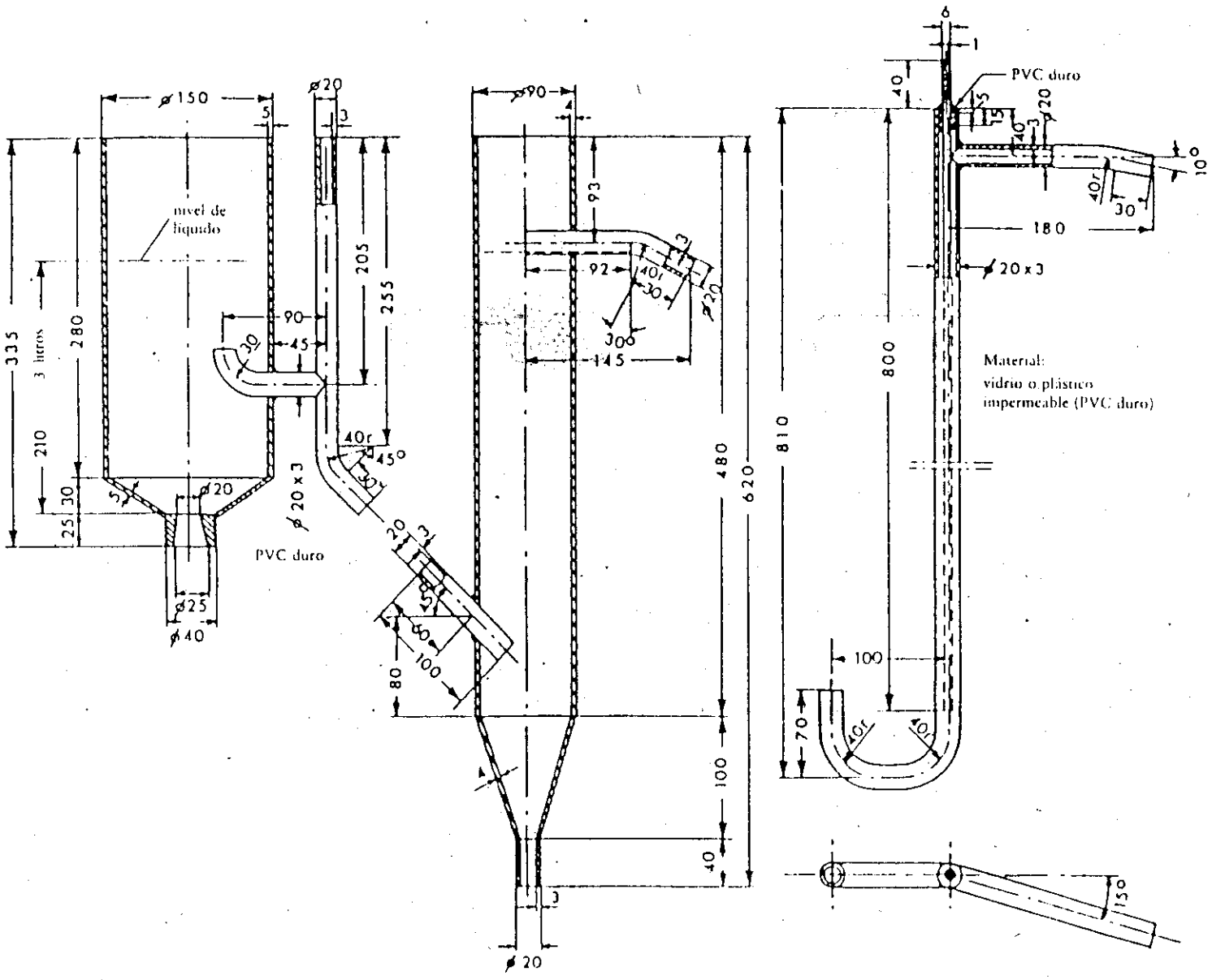
Anexo 1

Figura 1



A = recipiente de almacenaje
B = mecanismo de administracion
C = cámara de aireacion
D = recipiente de sedimentacion
E = bomba de aire
F = recipiente para recoger la sustancia
G = aireador
H = contador de corriente de aire (opcional).

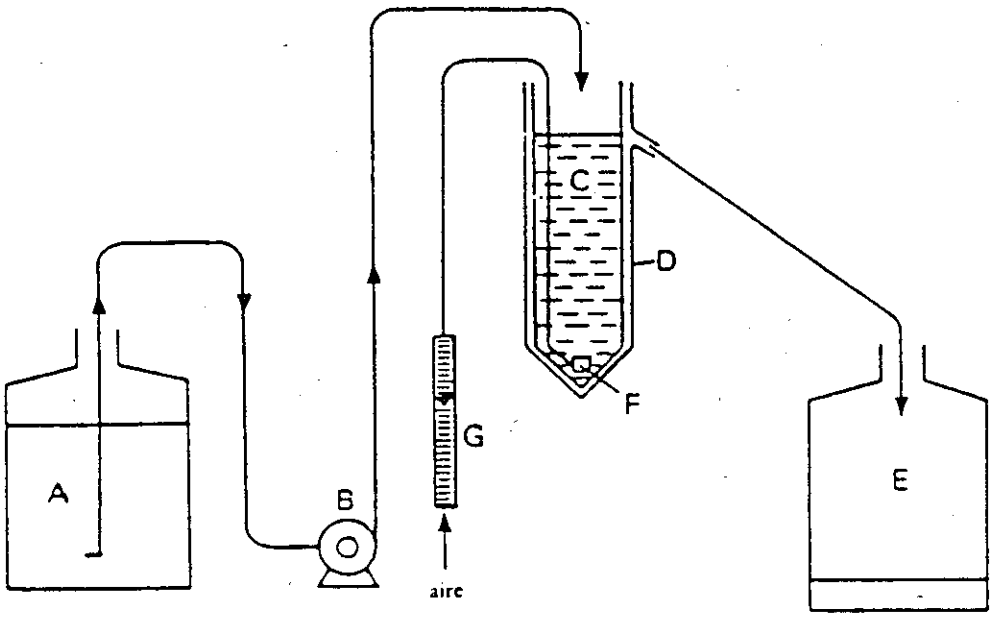
Figura 2


nivel de líquido
3 litros
PVC duro
PVC duro
Material:
vidrio o plástico
impermeable (PVC duro)

Anexo 2

Figura 1

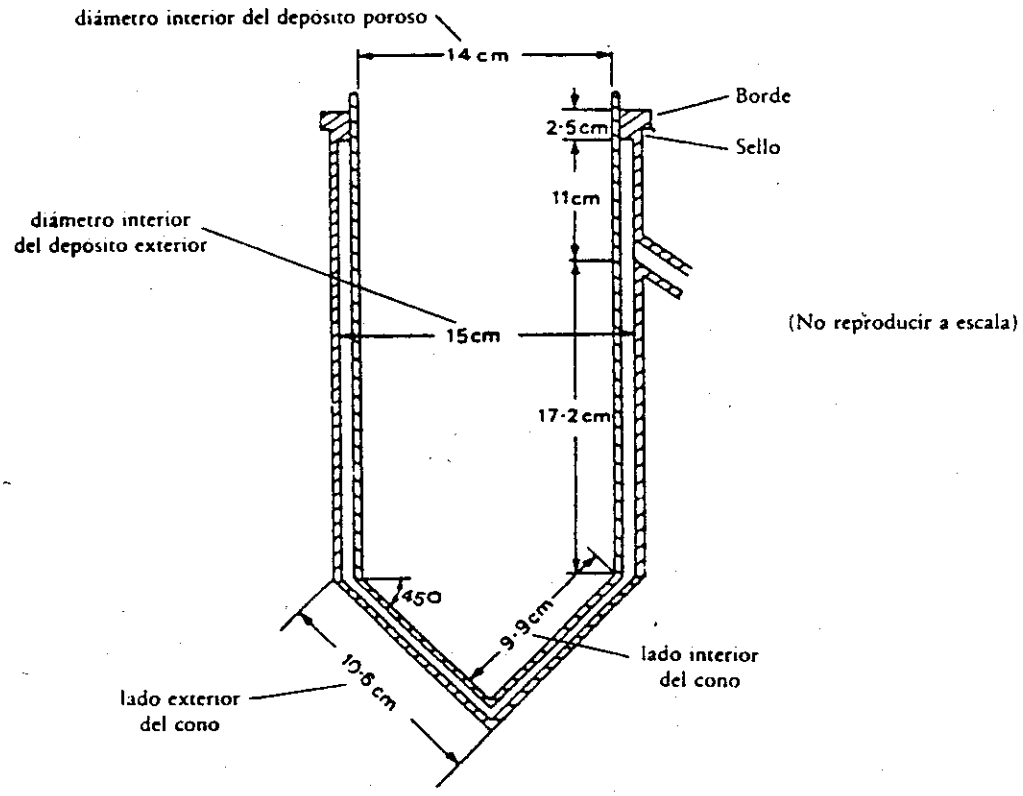
Equipo utilizado para valorar la biodegradabilidad



A = recipiente de almacenaje
B = bomba de administración
C = recipiente de aireación poroso
D = recipiente impermeable exterior
E = recipiente para recoger el efluente
F = aireador con piedra difusora
G = contador de corriente (opcional).

Figura 2

Detalles del recipiente de aireación con depósito poroso de tres litros



(No reproducir a escala)

Anexo 3

Condiciones de funcionamiento del ensayo de simulación con lodo activado

Márquese la respuesta en cada grupo

Aparato

confirmatorio OCDE ☐
depósito poroso ☐

Método de funcionamiento

unidad sencilla ☐
unidades acopladas ☐
unidades no acopladas ☐

Transinoculación

ninguna ☐
lodo activado ☐
sobrenadante ☐

Tiempo medio de retención

3 horas ☐
6 horas ☐

Alimento de base

aguas residuales domésticas ☐
aguas residuales sintéticas ☐

Inóculo

efluente secundario ☐
compuesto ☐
lodo activado ☐

Adición del material de ensayo

desde el principio ☐
incremento gradual ☐
tras la formación del lodo ☐

Análisis

específico ☐
DQO ☐
COD ☐

BIODEGRADACIÓN

C.10. LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El método descrito en este Anexo sirve para evaluar el efecto que la sustancia objeto de ensayo tiene sobre los microorganismos, midiendo la tasa de respiración en unas condiciones determinadas y en presencia de concentraciones diferentes de la misma.

El propósito de este método consiste en establecer un método de investigación rápido por el que se puedan identificar las sustancias que afectan de manera adversa a las plantas de tratamiento microbiano aerobico, así como indicar las concentraciones no inhibitorias apropiadas de las sustancias objeto de ensayo que vayan a ser utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad.

Una prueba preliminar puede realizarse antes de la prueba definitiva. Esta nos facilitará información acerca del rango de concentraciones que deben utilizarse en la prueba final.

Al proyectar la prueba se incluyen dos muestras control sin la sustancia objeto de ensayo, una al principio y otra al final de la serie de pruebas. Cada lote de lodo activado debe ser revisado utilizando una sustancia de referencia.

Este método es más fácilmente aplicable a sustancias que, debido a su solubilidad en agua y a su baja volatilidad, es probable que permanezcan en el agua.

Para sustancias con solubilidad limitada en el medio de prueba, puede que no sea posible la determinación del valor CE_{50}.

Cuando la sustancia de prueba es propensa a provocar la fosforilación oxidativa, los resultados basados en la disminución de oxígeno pueden conducir a conclusiones erróneas.

Para realizar el ensayo conviene disponer de la siguiente información:

— solubilidad en agua

— presión de vapor

— fórmula estructural

— pureza de la sustancia objeto del ensayo.

Recomendación:

El lodo activado puede contener organismos protencialmente patógenos; manéjese con cuidado.

1.2. Definiciones y unidades

La tasa de respiración es el consumo de oxígeno que tiene lugar en el lodo activado en condiciones aerobias por los microorganismos procedentes de aguas residuales; se expresa generalmente en mg 02 por mg de lodo en una hora.

Para poder calcular el efecto inhibitorio de una sustancia de prueba a una determinada concentración, la tasa de respiración se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de las dos muestras control.

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{porcentaje de inhibición}$$

donde:

R_s = consumo de oxígeno de la sustancia de prueba a la concentración utilizada en el ensayo

RC_1 = consumo de oxígeno de la muestra control 1

RC_2 = consumo de oxígeno de la muestra control 2.

En este método el valor CE_{50} expresa la concentración de la sustancia de prueba en la que la tasa de respiración es el 50 % de la obtenida en la muestra control, en las condiciones descritas en el método de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

Como sustancia de referencia, se recomienda utilizar 3,5-diclorofenol, conocido inhibidor de la respiración, efectuando una prueba para determinar el valor de CE_{50} en cada lote de lodo activado, a fin de comprobar que la sensibilidad del lodo no es anormal.

1.4. Principio del método

La tasa de respiración de un lodo activado alimentado con una cantidad estándar de agua residual sintética, se determina después de un tiempo de contacto de 30 minutos, o de tres horas, o de ambos. La tasa de respiración del mismo lodo activado se mide también en presencia de varias concentraciones de la sustancia de prueba y en condiciones idénticas. El efecto inhibitorio de la sustancia de prueba, a una determinada concentración, se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de dos muestras control. El valor de CE_{50} se calcula mediante determinaciones realizadas a diferentes concentraciones.

1.5. Criterios de calidad

Los resultados de la prueba son válidos si:

— las tasas de respiración de las muestras de control difieren una de la otra en menos de 15 %;

— el valor de CE_{50} (30 minutos y/o tres horas) del 3,5-diclorofenol está dentro de los límites aceptados de 5 a 30 mg/l.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. Soluciones de la sustancia de prueba

Las soluciones de la sustancia objeto del ensayo se preparan en el momento de comenzar el estudio, usando una solución madre. Para esta solución, es apropiada una concentración de 0,5 gr/l, si se sigue el procedimiento recomendado más abajo.

1.6.1.2. Solución de la sustancia de control

Puede prepararse por ejemplo una solución de 3,5-diclorofenol disolviendo 0,5 g de 3,5-diclorofenol en 10 ml de NaOH, 1 M, diluyendo esta mezcla con agua destilada hasta un volumen de 30 ml aproximadamente, añadiendo a continuación y a la vez que se agita H_2SO_4 0,5 M hasta el punto de precipitación incipiente, para lo que se requieren 8 ml aproximadamente de H_2SO_4 0,5 M, y finalmente diluyendo la mezcla con agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de esta solución deberá estar entre 7 y 8.

1.6.1.3. Aguas residuales sintéticas

El agua residual sintética para alimentación de los lodos se obtiene disolviendo las siguientes cantidades de sustancias en un litro de agua:

— 16 g de peptona

— 11 g de extracto de carne

— 3 g de urea

— 0,7 g de NaCl

— 0,4 g de $CaCl_2.2H_2O$

— 0,2 g de $MgSo_4.7H_2O$

— 2,8 g de K_2HPO_4.

Nota 1: Estas aguas residuales sintéticas están 100 veces más concentradas que las descritas en el Informe Técnico de la OCDE, «Método propuesto para la determinación de la biodegradabilidad de los tensoactivos utilizados en los detergentes sintéticos» del 11 de junio de 1976; además se les añade fosfato bipotásico.

Nota 2: Si el medio así preparado no va a utilizarse inmediatamente, deberá conservarse en la oscuridad y a una temperatura de 0 a 4° C, durante un período que no exceda de una semana y en condiciones que no provoquen cambio alguno en su composición. También puede esterilizarse antes de su conservación, o bien añadir los extractos de peptona y carne poco antes de efectuar la prueba. Antes de utilizar la solución, deberá mezclarse a fondo y regular su pH.

1.6.2. *Aparato de medida*

El dibujo exacto no es crítico. Sin embargo, no debe quedar espacio en la cabeza y la muestra debe encajar herméticamente en el cuello del frasco de medida.

Se necesita un equipamiento normal de laboratorio y, especialmente, lo siguiente:

— aparato de medida

— dispositivo de aireación

— electrodo de pH y equipo de medida

— electrodo de O_2.

1.6.3. *Preparación del inóculo*

El inóculo microbiano para esta prueba proviene del lodo activado procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales predominantemente domésticas.

Si es necesario, al volver al laboratorio, pueden eliminarse las partículas gruesas o grumos dejando sedimentar un poco, por ejemplo durante 15 minutos, y decantando la capa superior de sólidos más finos para su uso. También puede mezclarse el lodo con un mezclador durante algunos segundos.

Si se piensa que puede hallarse presente material inhibidor, deberá lavarse el lodo con agua corriente o con una solución isotónica. Después de centrifugar se decanta el sobrenadante (Este procedimiento se repite tres veces).

Seguidamente, se pesa y se seca una pequeña cantidad de lodo lavado. A partir de estos resultados, se puede calcular la cantidad de lodo húmedo que debe ser suspendida en agua para obtener un lodo activado con un rango de concentración de sólidos en suspensión de 2 a 4 gr/L. Este nivel supone una concentración entre 0,8 y 1,6 gr/l en el medio de prueba, si se sigue el procedimiento recomendado más adelante.

Si no pudiera utilizarse el lodo el mismo día en que se ha recogido, se añadirán 50 ml de aguas residuales sintéticas a cada litro de lodo activado que haya sido preparado como se describe anteriormente; esta mezcla se airea durante la noche a una temperatura de 20 ± 2° C, y se mantiene en estas condiciones durante el día, preparado para su utilización. Antes de utilizarlo, se comprueba el pH y, si es necesario, éste se ajusta hasta un valor de entre 6,0 y 8,0. El nivel de sólidos en suspensión se determina como se describe en el párrafo anterior.

Si en días posteriores (cuatro como máximo), es necesario utilizar el mismo lote de lodo, se le añaden 50 ml de aguas residuales sinteticas por litro de lodo al final de cada día de trabajo.

1.6.4. *Realización de la prueba*

Duración/tiempo de contacto:	30 minutos y/o tres horas, tiempo durante el cual tiene lugar la aireación.
Agua:	Agua potable (si es necesario, declorada).
Suministro de aire:	Aire limpio, sin aceite. Caudal de aire de 0,5 a 1 litro/minuto.
Aparato de medida:	Matraz de fondo plano, como por ejemplo, un frasco DBO (véase la figura 1).
Medidor de oxígeno:	Electrodo de oxígeno adecuado, con un registrador.
Solución nutritiva:	Aguas residuales sintéticas (véase más arriba).
Sustancia de prueba:	La solución de prueba se prepara en el momento de comenzar la prueba.
Sustancia de referencia:	Por ejemplo, 3,5-diclorofenol (tres concentraciones como mínimo).
Muestra de control:	Muestra inoculada sin sustancia de prueba.
Temperatura:	20 ± 2 °C.

A continuación se sugiere un procedimiento experimental, que puede seguirse para ambas sustancias, la de prueba y la de referencia, y para un período de contacto de tres horas:

Se utilizan varios recipientes (por ejemplo, vasos de precipitado de 1 litro).

Se usarán como mínimo cinco concentraciones, distanciadas por un factor constante que, preferiblemente, no exceda de 3,2.

A tiempo «O», se mezclan 16 ml de cultivo de aguas residuales sintéticas con agua, hasta obtener 300 ml, a los que se añaden 200 ml de inóculo microbiano, y la mezcla total (500 ml) se vierte en el primer recipiente (primera muestra de control, C_1). Los recipientes de la prueba deberán airearse continuamente para asegurar que el O_2 disuelto no se hace menor de 2,5 mg/l y que, justo antes de la medida de la tasa de respiración, la concentración de O_2 deberá ser de unos 6,5 mg/l.

A los 15 minutos (15 minutos es un intervalo arbitrario, aunque conveniente), se repite el procedimiento anterior, con la diferencia de que, antes de añadir agua hasta llegar a 300 ml e inóculo microbiano hasta obtener un volumen de 500 ml, se añaden 100 ml de la solución madre de sustancia de prueba a los 16 ml de aguas residuales sintéticas. Seguidamente, esta mezcla se vierte en un segundo recipiente y se airea como se ha expuesto anteriormente. Este proceso se repite a intervalos de 15 minutos con diferentes volúmenes de solución madre de sustancia de prueba, para obtener una serie de recipientes que contengan concentraciones diferentes de la sustancia de prueba. Finalmente, se prepara una segunda muestra de control (C_2).

Después de tres horas se mide el pH y se vierte bien mezclado el contenido del primer recipiente en el aparato de medida, en el que se mide la tasa de respiración durante un periodo de hasta 10 minutos.

Esta determinación se repite a intervalos de 15 minutos con el contenido de cada recipiente, de tal manera que el tiempo de contacto de cada recipiente sea de tres horas.

La sustancia de referencia se prueba en cada lote de inóculo microbiano siguiendo el mismo procedimiento.

Cuando vayan a tomarse las medidas después de 30 minutos de contacto, se necesitará un régimen diferente (por ejemplo, más de un medidor de oxígeno).

Cuando sea necesario medir el consumo químico de oxígeno, se preparan más recipientes que contengan la sustancia de prueba, el medio nutriente de aguas residuales sintéticas y agua, pero no lodo activado.

El consumo de oxígeno se mide y se registra después de un tiempo de aireación de 30 minutos y/o de tres horas (tiempo de contacto).

2. DATOS Y EVALUACIÓN

La tasa de respiración se calcula a partir del trazado del registrador en mg O_2/l.h, con valores aproximados de entre 6,5 mg O_2/l y 2,5 mg O_2/l, o cuando la tasa de respiración sea baja, durante un período de 10 minutos. La parte de la curva de respiración sobre la que se mide la tasa de respiración debe ser lineal.

Cuando las tasas de respiración de las dos muestras de control difieran en más del 15 por ciento o el valor de CE_{50} (30 minutos y/o tres horas) de la sustancia de referencia no quede dentro de la gama aceptada (de 5 a 30 mg/l para el 3,5-diclorofenol), la prueba no será válida y deberá repetirse.

El porcentaje de inhibición se calcula para cada concentración de prueba como se ha descrito anteriormente, y se representa gráficamente en función de la concentración en un papel logarítmico normal (o logaritmo-probabilidad), para obtener el valor de CE_{50}.

Los límites de confianza del 95 % de los valores de CE_{50} se pueden determinar usando procedimientos establecidos.

3. INFORMES

3.1. Informe de la prueba

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- sustancia de prueba: datos de identificación química
- sistema de prueba: fuente, concentración y cualquier tratamiento previo del lodo activado
- condiciones de la prueba:
  - pH de la mezcla de reacción antes de la medición de la respiración
  - temperatura de prueba
  - duración de la prueba
  - sustancia de referencia y su valor medido de CE_{50}
  - absorción abiótica de oxígeno (si la hubiere)
- resultados:
  - todos los datos medidos
  - curva de inhibición y método para calcular el valor de CE_{50}.
  - valor de CE_{50} y, si es posible, límites de confianza del 95%, CE_{20} y CE_{80}.
  - todas las observaciones y cualquier desviación de este método de prueba que pueda haber influido sobre el resultado.

3.2. Interpretación de los datos

El valor de CE_{50} se considerará solamente como indicación de los probables efectos tóxicos de la sustancia de prueba sobre los microorganismos de aguas residuales o de depuración de lodo activado, si se tiene en cuenta que las complejas interacciones que ocurren en el medio ambiente no pueden ser simuladas con precisión de una prueba de laboratorio. Además, las sustancias de prueba que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la oxidación amónica pueden producir también curvas de inhibición atípicas. En razón de esto, dichas curvas deberán interpretarse con cautela.

4. REFERENCIAS

(1) International Standard ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).

(3) Brown, D., Hitz, H. R., and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, also described by:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 80 (1976).

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 247 (1977).

(7) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 209*, Decisión del Consejo C(81) 30 final.

BIODEGRADACIÓN

C.11. PRUEBA LASC MODIFICADA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método es la evaluación del potencial de biodegradabilidad última o total de sustancias orgánicas hidrosolubles y no volátiles, cuando se exponen a concentraciones relativamente altas de microorganismos durante un largo período de tiempo. Se mantiene durante este período la viabilidad de los microorganismos añadiendo diariamente una alimentación de aguas residuales decantadas. Para las necesidades del fin de semana, pueden almacenarse las aguas residuales a 4 ° C. Pueden emplearse como alternativa las aguas residuales sintéticas de la prueba de confirmación OCDE.

Puede producirse una absorción fisicoquímica sobre los sólidos en suspensión, y este hecho deberá tomarse en cuenta al interpretar los resultados (véase 3.2).

Debido al largo período de retención de la fase líquida (36 horas) y a la adición intermitente de nutrientes, la prueba no simula las condiciones reinantes en una planta depuradora de aguas residuales. Los resultados obtenidos con diversas sustancias de prueba indican que la prueba tiene un elevado potencial de biodegradación.

Las condiciones que la prueba establece son muy favorables a la selección y/o adaptación de microorganismos capaces de degradar el compuesto de prueba (El procedimiento puede utilizarse también para obtener inóculos aclimatados destinados a emplearse en otras pruebas).

En este método se emplea la medida de la concentración del carbono orgánico disuelto para evaluar la biodegradabilidad total de las sustancias de prueba. Resulta preferible determinar el COD por acidificación y purgado más que por la diferencia de C_{total}-$C_{inorgánico}$.

El empleo simultáneo de un método analítico específico puede permitir también evaluar la degradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas de prueba que, a la concentración empleada en la prueba,

— sean solubles en agua, (como mínimo, 20 mg de carbono orgánico disuelto/L)

— posean una presión de vapor despreciable

— no posean efecto inhibidor sobre las bacterias

— no se absorban significativamente dentro del sistema de prueba

— no escapen de la solución de prueba por formación de espumas.

Deberá determinarse el contenido de carbono orgánico del material de prueba.

Para interpretar los resultados obtenidos, será útil la información sobre las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de prueba, particularmente en los casos para los que los resultados sean bajos o marginales.

Para la interpretación de resultados bajos y para la selección de una concentración de prueba idónea podrá ser útil la información sobre la toxicidad de la sustancia de prueba para los microorganismos.

1.2. Definiciones de unidades

C_T = concentración del compuesto de prueba como carbono órganico presente o añadido a las aguas residuales sedimentadas al comienzo del período de aireación (mg/l).

C_t = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante de la prueba al término del período de aireación (mg/l)

C_e = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante del control al término del período de aireación (mg/l).

En este método, la biodegradación se define como la desaparición del carbono orgánico. La biodegradación puede expresarse como:

1. La eliminación porcentual D_{ad} de la cantidad de sustancia añadida diariamente:

$$D_{ad} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

D_{ad} = degradación/adición diaria.

2. La eliminación porcentual D_{sid} de la cantidad de sustancia presente al inicio de cada día:

$$D_{sid} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ b)]$$

D_{sid} = degradación/substancia al inicio del día.

Donde los índices i y (i + 1) se refieren al día de la medición. Se recomienda la ecuación [2 a)] si el COD efluente varía de día a día, mientras que la ecuación [2 b)] puede emplearse cuando el COD efluente permanezca relativamente constante de un día para otro.

1.3. **Sustancias de referencia**

En algunos casos, al investigar una sustancia nueva, serán útiles las sustancias de referencia; sin embargo, no se recomienda en el método ninguna sustancia de referencia específica.

Se proporcionan los datos de diversos compuestos evaluados en pruebas efectuadas en varios laboratorios (véase Anexo 1). En principio esto puede ser llevado a cabo periódicamente como calibración del método y para comparar los resultados obtenidos cuando se emplea un método distinto.

1.4. **Principio del método de la prueba**

Se coloca en una unidad de lodo activado semicontinuo (LASC) lodo activado procedente de una planta depuradora de aguas residuales. Se añaden el compuesto de prueba y aguas residuales domésticas decantadas, aireándose la mezcla durante 23 horas. Se interrumpe entonces la aireación, permitiéndose que el lodo se deposite por sedimentación y retirándose el líquido sobrenadante.

Se mezcla a continuación el lodo que permanece en la cámara de aireación con una cantidad igual del compuesto de prueba y de aguas residuales, repitiéndose el ciclo.

La biodegradación se determina por el contenido en carbono orgánico disuelto del líquido sobrenadante. Se compara dicho valor con el obtenido en un tubo de control en el que se han introducido sólo aguas residuales decantadas.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradabilidad (biodegradabilidad primaria).

1.5. **Criterios de calidad**

No ha sido bien establecida aún la reproducibilidad de este método basado en la eliminación del carbono orgánico disuelto (Cuando se considera la biodegradación primaria, se obtienen datos muy precisos para las sustancias degradadas en gran medida).

La sensibilidad del método viene determinada en gran parte por la variabilidad del control y, en menor grado, por la precisión de la determinación del carbono orgánico disuelto y por el contenido del compuesto de prueba en el líquido al comienzo de cada ciclo.

1.6. **Descripción del procedimiento de la prueba**

1.6.1. *Preparativos*

Se reúne un número suficiente de unidades limpias de aireación (también puede usarse alternativamente la unidad original de prueba LASC de 1,5 l) y de tubos de entrada de aire (figura 1) para cada sustancia de prueba y para los controles. El aire comprimido suministrado a las unidades de prueba, que se purifica pasándolo por un filtro de lana de algodón, debe hallarse exento de carbono orgánico y presaturado con agua, a fin de reducir las pérdidas por evaporación.

Se toma una muestra de líquido mixto, que contenga de 1 a 4 g de sólidos en suspensión por litro de una central depuradora de lodo activado en la que se depuren sobre todo aguas residuales domésticas. Para cada unidad de aireación se requieren aproximadamente 150 ml de líquido mixto.

Se preparan en agua destilada soluciones madre de la sustancia de prueba; la concentración exigida normalmente es de 400 mg/l como carbono orgánico, lo que supone una concentración del compuesto de prueba de 20 mg/l de carbono al inicio de cada ciclo de aireación, si no tiene lugar una biodegradación.

Pueden emplearse concentraciones más altas si la toxicidad frente a los microorganismos lo permite.

Se mide el contenido en carbono orgánico de las soluciones madre.

1.6.2. *Condiciones de la prueba*

La prueba deberá llevarse a cabo a 20 a 25° C.

Se utiliza una concentración elevada de microorganismos aerobios (de 1 a 4 g/l de sólidos en suspensión), y el período efectivo de retención es de 36 horas.

La materia carbonada existente en las aguas residuales que sirven de alimentación resulta oxidada en gran medida, normalmente al cabo de 8 horas tras el inicio de cada ciclo de aireación. A continuación, el lodo respira endógenamente durante el resto del período de aireación, siendo entonces el compuesto de prueba el único sustrato disponible, a menos que éste resulte también rápidamente metabolizado. Estos factores, junto con el de la reinoculación diaria de la solución de prueba cuando se utilizan como medio aguas residuales domésticas, ofrecen condiciones muy favorables para que se produzcan la aclimatación y un alto grado de biodegradación.

1.6.3. *Ejecución de la prueba*

Se toma una muestra de líquido mixto de una estación de depuración de lodo activado predominantemente de origen doméstico, o bien de un laboratorio, y se mantiene en condiciones aerobias hasta emplearla en el laboratorio. Se llena cada unidad de aireación, y la unidad de control, con 150 ml (si se utiliza la unidad original de prueba LASC, deben multiplicarse los volúmenes dados por 10) de líquido mixto, y se da inicio a la aireación. Transcurridas 23 horas, se interrumpe la aireación y se permite que el lodo sedimente durante 45 minutos. Se abre sucesivamente la espita de cada recipiente, y se retiran de cada uno 100 ml del líquido sobrenadante. Se toma, inmediatamente antes de su uso, una muestra de aguas residuales domésticas decantadas y se añaden 100 ml al lodo que permanece en cada unidad de aireación. Se vuelve a comenzar la aireación. En esta fase no se añaden sustancias de prueba, y las unidades se alimentan diariamente con aguas residuales domésticas sólo hasta que se obtenga un líquido sobrenadante transparente después de la decantación. El tiempo necesario para ello es por lo general de 2 semanas, transcurridas las cuales el carbono orgánico disuelto contenido en el líquido sobrenadante al término de cada ciclo de aireación se acerca a un valor constante.

Al término de este período, se mezclan los diferentes lodos decantados, y se añaden a cada unidad 50 mL del lodo compuesto resultante.

Se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de agua a las unidades control; por su parte, a las unidades de ensayo se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de la solución madre (400 mg/l) del compuesto en estudio. Se recomienza la aireación y se mantiene durante 23 horas. Se deja entonces que el lodo decante durante 45 minutos, recogiéndose a continuación el líquido sobrenadante y analizándose el mismo, a fin de establecer su contenido en carbono orgánico disuelto.

Se repite diariamente durante toda la duración de la prueba el procedimiento mencionado de llenado y recogida.

Antes de la sedimentación, puede resultar necesario limpiar las paredes de las unidades para impedir que se acumulen sólidos por encima del nivel de líquido. Se utiliza para cada unidad un raspador o un cepillo individual, a fin de impedir que se produzca una contaminación cruzada.

Idealmente, el carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes se determinará diariamente, aunque puede permitirse una frecuencia menor de análisis. Antes de efectuar el análisis, se filtran los líquidos a través de filtros de membrana de 0,45 um lavados o se centrifugan los mismos. Los filtros de membrana son adecuados si es seguro que ni liberan carbono ni absorben sustancia en la fase de filtración. La temperatura de la muestra no debe superar los 40 °C mientras se halle dentro de la centrífuga.

La duración de la prueba para compuestos con poca o ninguna degradación es indeterminada, pero la experiencia sugiere que generalmente debería alcanzar al menos 12 semanas, sin superar las 26.

2. **DATOS Y EVALUACIÓN**

Se representan en un diagrama frente al tiempo, los valores del carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes de las unidades de prueba y de las unidades de control.

Según se va produciendo la biodegradación, el nivel encontrado en la muestra se aproximará al nivel del control. Una vez que la diferencia entre los dos niveles resulta constante para tres medidas consecutivas, se efectúa el número de medidas adicionales que sea suficiente para permitir el tratamiento estadístico de los datos, y se calcula con ellos la biodegradación porcentual del compuesto de prueba (D_{ad} o D_{sid}, véase 1.2).

3. **INFORME**

3.1. **Informe de la prueba**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— toda la información sobre el tipo de aguas residuales, el tipo de unidad empleado y los resultados experimentales relativos a la sustancia probada, la sustancia de referencia (si se usa), y el control

— la temperatura

— la curva de eliminación, con descripción y método de cálculo (véase 1.2)

— la fecha y el emplazamiento donde se tomó la muestra del lodo activado y de las aguas residuales, el estado de adaptación, concentración, etc.

— razones científicas para efectuar cualquier modificación del procedimiento de la prueba

— firma y fecha.

3.2. **Interpretación de los resultados**

Dado que la sustancia que deberá probarse con este método no será fácilmente biodegradable, toda eliminación del COD debida exclusivamente a la biodegradación será normalmente gradual, extendiéndose durante días o semanas, excepto en los casos en los que la aclimatación sea brusca, como indica una desaparición abrupta que tenga lugar tras algunas semanas.

Sin embargo, la absorción fisicoquímica puede jugar en ocasiones un papel importante; esto se apreciará cuando se produzca desde el principio una eliminación completa o parcial del COD añadido. Lo que sucede a continuación depende de factores tales como los grados de absorción y la concentración de sólidos en suspensión en la descarga del efluente. Generalmente, la diferencia entre las concentraciones del COD en los líquidos de control y en los líquidos sobrenadantes de la prueba se incrementa gradualmente a partir de un valor inicial bajo, permaneciendo a continuación con el nuevo valor durante el resto del experimento a menos que tenga lugar la aclimatación.

Si debe llevarse a cabo una distinción entre la biodegradación (o la biodegradación parcial) y la absorción, son necesarias otras pruebas. Estas pueden efectuarse de diversas maneras, pero la más convincente consiste en utilizar el líquido sobrenadante, o el lodo, como inóculo para una prueba de grupo base (preferiblemente una prueba respirométrica).

Las sustancias de prueba que produzcan una eliminación alta y no adsortiva del COD en esta prueba deberán considerarse como potencialmente biodegradables. La eliminación parcial y no adsortiva indica que el producto químico experimenta al menos algo de biodegradación.

Las eliminaciones bajas o nulas del COD pueden ser debidas a que la sustancia de prueba tiene efecto inhibidor sobre los microorganismos, y esto puede quedar de manifiesto también por lisis y pérdida de lodo, produciéndose sobrenadantes turbios. En este caso, deberá repetirse la prueba empleando una concentración menor de la sustancia de prueba.

El empleo de un método analítico específico, o de una sustancia de prueba marcada con ^{14}C puede proporcionar una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de prueba marcado con ^{14}C, la recuperación de $^{14}CO_2$ confirmará que ha tenido lugar la biodegradación.

Cuando los resultados se expresen también en términos de biodegradación primaria, deberá explicarse también, si ello es posible, el cambio en la estructura química que produce la pérdida de respuesta de la sustancia inicial de prueba.

Deberá indicarse la validación del método analítico junto con la respuesta encontrada con el medio del control.

4. **REFERENCIAS**

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 A*, Decisión del Consejo C(81) 30 final.

Anexo 1

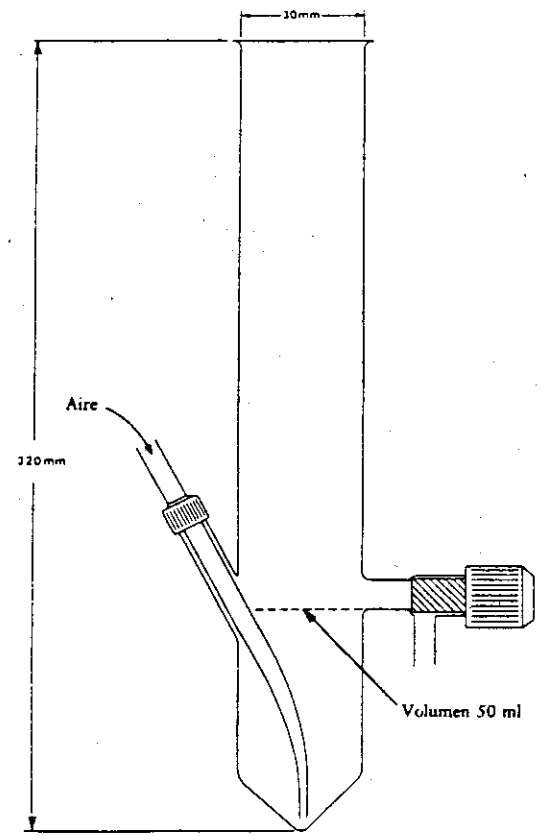
Prueba LASC: Ejemplo de resultados

Sustancia	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Porcentaje de biodegradación (D_{ad})	Duración del ensayo (días)
4-acetil aminobenceno sulfonato	17,2	2,0	85,0	40
Tetra propilen benceno sulfonato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenil	16,9	0,8	95,3	40
Dietil glicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetra ciclopentano carboxilato	17,9	3,2	81,1	120

Anexo 2

Ejemplo del aparato de ensayo

Figura 1



C.12. TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA

ENSAYO CON SUELO ARTIFICIAL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

En este ensayo de laboratorio, la sustancia con la que se va a experimentar se añade a un suelo artificial en el que se colocan gusanos durante 14 días. Después de este período (que, opcionalmente, puede ser de siete días) se examina el efecto letal de la sustancia sobre los gusanos. Este ensayo provee un método que permite investigar, a relativamente corto plazo, los efectos causados por sustancias químicas sobre los gusanos, por absorción oral o cutánea.

1.2. Definición y unidades

CL_{50}: Concentración de una sustancia que se considera la causante de la muerte del 50 % de los animales investigados durante el período de ensayo.

1.3. Sustancia de referencia

Se utiliza periódicamente una sustancia de referencia como medio para demostrar que la sensibilidad del sistema de ensayo no ha cambiado de manera significativa.

Se recomienda que esta sustancia sea la cloroacetamida de grado analítico.

1.4. Principio del ensayo

Por ser el suelo un medio variable, para este ensayo se utiliza marga artificial definida cuidadosamente. Los gusanos adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota del Anexo) se mantienen en una tierra artificial que se trata con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo. El contenido de los recipientes se extiende sobre una bandeja a los 14 días (opcionalmente, pueden ser siete) del comienzo del ensayo y se cuenten los gusanos supervivientes para cada concentración.

1.5. Criterios de calidad

El ensayo se proyecta de forma que sea lo más reproducible posible con respecto al sustrato y al organismo de ensayo. La mortalidad en los controles no debe exceder del 10 % al final del ensayo, o de lo contrario éste no es válido.

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. *Materiales*

1.6.1.1. Sustrato de ensayo

Como sustrato básico de ensayo usa un suelo artificial definido.

a) Sustrato básico (los porcentajes se expresan en términos de peso en seco:
   - 10 % de turba esfágnea (con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0, sin restos visibles de plantas y finamente molida).
   - 20 % de arcilla de caolinita, preferiblemente con más de un 50 % de caolinita
   - Alrededor del 69 % de arena de cuarzo industrial (predominando la arena fina, en la que más del 50 % de sus partículas sean de un tamaño de 0,05 a 0,2 mm). Si la sustancia no es lo suficientemente dispersable en agua, se deberán mantener disponibles 10 g por cada recipiente de ensayo para mezclarlos con la sustancia de ensayo más adelante.
   - Alrededor de un 1 % de carbonato cálcico (CO_3Ca), pulverizado y químicamente puro, que se añade con el fin de que el valor del pH sea de 6,0 ± 0,5.

b) Sustrato de ensayo:

   El sustrato de ensayo contiene el sustrato básico, la sustancia de ensayo y agua desionizada.

   El contenido de agua oscila entre el 25 y el 42 % del peso en seco del sustrato básico. El contenido de agua de un sustrato se determina secando una muestra a una temperatura de 105° C, hasta alcanzar un peso constante. El criterio clave consiste en humedecer la tierra artificial hasta un punto en que no quede agua estancada. Se debe tener cuidado al hacer la mezcla, de manera que se obtenga una distribución uniforme de la sustancia de ensayo y del sustrato. Deberá registrarse la manera en que se introduce la sustancia de ensayo en el sustrato.

c) Sustrato de control:

   El sustrato de control contiene el sustrato básico y agua. Si se usa un agente aditivo, el sustrato de control adicional debe contener la misma cantidad de agente aditivo.

1.6.1.2. Recipientes de ensayo

Se utilizan recipientes de cristal (cubiertos adecuadamente con membranas, tapaderas o película de plástico con agujeros de ventilación) aproximadamente de un litro de capacidad y llenos de una cantidad de sustrato de ensayo húmedo o de control que sea equivalente a un peso en seco de 500 g de sustrato.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

Los recipientes se deberán mantener en cámaras climatizadas, a una temperatura de 20 (± 2)° C, con luz continua. La intensidad de la luz será de 400 a 800 lux.

El período de ensayo dura 14 días, aunque, opcionalmente, se puede evaluar la mortalidad a los siete días del comienzo del ensayo.

1.6.3. *Procedimiento de ensayo*

Concentraciones del ensayo

Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso de sustancia por peso en seco de sustrato básico (mg/kg).

Ensayo para determinar la gama de concentraciones

Por medio de este ensayo se determina la gama de concentraciones que ocasiona porcentajes de mortalidad de cero a 100; con esta información se establece la gama de concentraciones que se vaya a utilizar en el ensayo definitivo.

La sustancia se estudiará a las siguientes concentraciones: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de sustancia / kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

Cuando vaya a realizarse un ensayo definitivo, bastará con un lote de ensayo para cada concentración y otro para el sustrato de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos, para llevar a cabo el ensayo de determinación de la gama de concentraciones.

Ensayo definitivo

Los resultados del ensayo para determinar la gama de concentraciones se usan para elegir cinco concentraciones como mínimo, en serie geométrica, que abarquen la gama de mortalidad del cero al 100 % y que difieran entre sí en un factor constante que no exceda de 1,8.

En los ensayos en que se utilice esta serie de concentraciones se estimará el valor de CL_{50} y de sus límites de confianza de la manera más precisa posible.

En el ensayo definitivo se utilizan, como mínimo, cuatro lotes de ensayo por concentración y cuatro sustratos de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos. Los resultados de estos lotes reproducidos son la media y la desviación típica.

Cuando de dos concentraciones consecutivas, en una proporción de 1,8, sólo se obtienen los porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL_{50}.

Mezcla del sustrato de ensayo básico y de la sustancia de ensayo

Siempre que sea posible, el sustrato de ensayo no deberá estar compuesto de ningún otro agente adicional que no sea agua. Inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se mezcla una emulsión o dispersión de la sustancia de ensayo en agua desionizada disolvente con el sustrato de ensayo básico, o se rocía dicha emulsión sobre éste de manera uniforme con un rociador cromatográfico fino o con un aparato similar.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo).

Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia de ensayo sólo pueden utilizarse los agentes que se volatilizan rápidamente. El sustrato de ensayo debe ser ventilado antes de usarlo. Se repondrá la cantidad de agua evaporada. El sustrato de control deberá contener la misma cantidad de agente aditivo. Si la sustancia de ensayo no fuese soluble, dispersable o emulsionable en disolventes orgánicos, se mezclarán 10 g de una mezcla de arena de cuarzo finamente molido y la cantidad necesaria de sustancia de ensayo para tratar 500 g (peso en seco) de suelo artificial, con 490 g (peso en seco) de sustrato de ensayo.

Por cada lote de ensayo, se coloca en cada recipiente de cristal una cantidad de sustrato de ensayo húmedo equivalente a 500 g de peso en seco, y en la superficie del mismo se colocan diez gusanos, que han sido acondicionados durante 24 horas en un sustrato básico húmedo similar y a los que, después de lavarlos rápidamente, se les ha extraído el exceso de agua con papel de filtro antes de usarlos.

Los recipientes se cubren con tapas de plástico perforado, platos o película para evitar el secado del sustrato, y se guardan bajo las condiciones de ensayo durante 14 días.

Se evaluarán los resultados después de 14 días (u opcionalmente, después de siete días) del comienzo del ensayo. El sustrato se extiende en una placa de vidrio o de acero inoxidable. Se examinan los gusanos y se determina el número de supervivientes. Los gusanos se consideran muertos si no responden a un suave estímulo mecánico en la parte frontal de su cuerpo.

Cuando el examen se efectúa a los siete días, el recipiente se vuelve a llenar con el sustrato y los gusanos supervivientes se colocan otra vez en la superficie del mismo.

1.6.4. *Organismos de ensayo*

Los organismos de ensayo deberán ser adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota en el Anexo) (como mínimo con dos meses de edad y con clitelo) y de un peso húmedo de 300 a 600 mg (véase el Anexo para el método de reproducción).

2. DATOS

2.1. Tratamiento y evaluación de los resultados

Las concentraciones de la sustancia ensayada se registran con referencia a los porcentajes correspondientes de gusanos de tierra muertos.

Cuando los datos son adecuados, el valor de CL_{50} y los límites de fiabilidad ($p = 0,05$) se determinan por medio de métodos estándar (como el de Litchfield y Wilcoxon, 1949, o un método equivalente). El valor de CL_{50} debe ser expresado en mg de sustancia de ensayo por kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

En los casos en que la pendiente de la curva de concentración es tan pronunciada que no puede calcularse el valor de CL_{50}, se considera suficiente una estimación gráfica de este valor.

Cuando de dos concentraciones consecutivas en una proporción de 1,8 sólo se obtienen porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL_{50}.

3. INFORMES

3.1. Informe del ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con los criterios de calidad mencionados anteriormente

— tipo de ensayo efectuado (ensayo de determinacion de la gama de concentraciones y/o ensayo definitivo)

— descripción exacta de las condiciones del ensayo o declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con el método; se informará de cualesquiera diferencias con respecto a dicho método

— descripción exacta de la manera en que se ha mezclado la sustancia de ensayo con el sustrato de ensayo básico

— información acerca de los organismos de ensayo (especie, edad, peso medio y gama de variación, condiciones relativas a reproducción y cría, abastecedor)

— método usado en la determinación del valor de CL_{50}

— resultados del ensayo, incluidos todos los datos utilizados

— descripción de los síntomas o de los cambios en el comportamiento de los organismos de ensayo que se hayan observado

— mortalidad en los sustratos de control

— valor de CL_{50} o la máxima concentración con mortalidad y la mínima con una mortalidad del 100 %, después de 14 días (y opcionalmente después de siete días) del comienzo del ensayo

— trazado de la curva de concentración — respuesta

— resultados obtenidos con la sustancia de referencia, ya sea en relación con el ensayo actual o con ejercicios previos de control de calidad.

4. REFERENCIAS

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 207*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) Edwards, D. A. and Lofty, J. R., 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, 331 pp.

(3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et Sysiematique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 96, 99-113.

(5) CEE 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Anexo

Reproducción y cría de los gusanos con anterioridad al ensayo

A fines de reproducción, se colocan en una caja de cría con sustrato fresco de 30 a 50 gusanos adultos, y se sacan después de 14 días. Estos animales se pueden utilizar para lotes de reproducción adicionales. Los gusanos nacidos de los capullos se utilizan en los ensayos una vez que han alcanzado la madurez (según las condiciones prescritas, después de dos a tres meses).

Condiciones de reproducción y cría

Cámara climatizada: a una temperatura de 20 (± 2)° C, preferiblemente con luz continua (intensidad de 400 a 800 lux).

Cajas de reproducción: recipientes poco profundos apropiados, con un volumen de 10 a 20 litros.

Sustrato: *Eisenia foetida:* Se puede criar en los excrementos de varios animales. Como medio de crianza se recomienda utilizar una mezcla con un 50% en volumen de turba y el otro 50% de excrementos de vaca o caballo. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato cálcico) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mmhos o una concentración de sal del 0,5 %).

El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado.

Además del método expuesto anteriormente, se pueden utilizar otros procedimientos con éxito.

Nota: Existen dos razas de *Eisenia foetida*, que algunos taxonomistas han subdividido en especies (Bouche, 1972). Estas dos razas son morfológicamente similares, aunque una de ellas, la *Eisenia foetida foetida*, exhibe rayas o bandas transversales típicas en los segmentos, mientras que a la otra, la *Eisenia foetida andrei*, de color rojizo jaspeado, le faltan. Siempre que sea posible se utilizará la *Eisenia foetida andrei*. Se pueden utilizar otras especies, siempre que se disponga de la metodología necesaria.

ANEXO VI

CRITERIOS GENERALES DE CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO DE SUSTANCIAS Y PREPARADOS PELIGROSOS.

PARTE I

Salvo las prescripciones en sentido contrario que se establezcan en las disposiciones especificas relativas a los preparados peligrosos, la clasificación de las sustancias y preparados en las categorias de muy tóxicos, tóxicos o nocivos se efectuará con arreglo a los criterios siguientes:

A. Cuando se haya determinado en animales la toxicidad aguda de la sustancias o preparados mediante un procedimiento que permita la valoración de la DL_{50} o CL_{50}, la clasificación en las categorias de muy tóxico, tóxico o nocivo se efectuará utilizando los siguientes parámetros como criterios de referencia:

Categoria	DL_{50} oral rata mg/kg	DL_{50} cutánea rata o conejo mg/kg	CL_{50} inhalatoria rata mg/litro/4 horas
Muy tóxicos	< 25	< 50	< 0,25
Tóxicos	25-200	50-400	0,25-1
Nocivos	200-2000	400-2000	1-5

B. Cuando se haya determinado en animales la toxicidad oral aguda de la sustancia o preparado mediante el procedimiento de dosis fija, la clasificación en las categorias de muy tóxico, tóxico o nocivo se efectuará en función de la dosis discriminante. Esta última consistirá en el nivel de la dosis que produzca una toxicidad evidente, pero no la muerte, y será uno de los cuatro niveles de dosis fija (5, 50, 500 o 2000 mg/kg de peso).

"Toxicidad evidente" es un término utilizado para describir los signos de toxicidad que tras la administración de una sustancia de ensayo, sean de tal gravedad, que la administración del nivel de dosis inmediatamente superior pueda suponer la muerte.

Dado que este método de ensayo se basa en la selección de dosis procedentes de una serie de dosis fijas , es inapropiado para dar una gama de valores a efectos de clasificación. Se utilizarán como valores de referencia los siguientes parámetros:

Categoria	Dosis discriminante mg/kg de peso
Muy tóxicos	< 5
Tóxicos	5
Nocivos	50-500

El nivel de dosis de 2000 mg/kg se utilizará principalmente para obtener información sobre los signos de toxicidad que puedan darse con sustancias de escasa toxicidad aguda y que no estén clasificadas en función de ella.

C. Cuando para la clasificación se desprenda de los hechos que no procede utilizar los valores de referencia mencionados en las letras A) y B) debido a que las sustancias o preparados produzcan otros efectos, dichos efectos se clasificarán de acuerdo con su importancia.

PARTE II

INDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS SEGÚN SUS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

2.1. Introducción

2.2. Criterios de clasificación, elección de los símbolos e indicaciones de peligro y elección de las frases de riesgo

2.2.1. Explosivos

2.2.2. Comburentes

2.2.3. Extremadamente inflamables

2.2.4. Fácilmente inflamables

2.2.5. Inflamables

2.2.6. Otras propiedades físico-químicas

3. CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS PROPIEDADES TOXICOLOGICAS

3.1. Introducción

3.2. Criterios de clasificación, elección de los símbolos e indicaciones de peligro y elección de las frases de riesgo

3.2.1. Muy tóxicos

3.2.2. Tóxicos

3.2.3. Nocivos

3.2.4. Observaciones sobre el uso de la R 48

3.2.5. Corrosivos

3.2.6. Irritantes

3.2.7. Sensibilizantes

3.2.8. Otras propiedades toxicológicas

4. CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS EFECTOS ESPECÍFICOS SOBRE LA SALUD HUMANA

4.1. Introducción

4.2. Criterios de clasificación, indicaciones de peligro y elección de las frases de riesgo

4.2.1. Sustancias carcinogénicas

4.2.2. Sustancias mutagénicas

4.2.3. Sustancias tóxicas para la reproducción

4.2.4. Procedimiento para la clasificación de preparados

5. CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS EFECTOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE

5.1. Introducción

5.2. Criterios de clasificación, indicaciones de peligro, elección de las frases de riesgo

5.2.1. Medio acuático

5.2.2. Medio no acuático

6. ELECCIÓN DE LAS FRASES DE CONSEJOS DE PRUDENCIA

6.1. Introducción

6.2. Frases de prudencia relativas a las sustancias y preparados peligrosos

7. PROPUESTA DE ETIQUETADO

8. CASOS ESPECIALES: Sustancias

8.1. Bombonas portátiles de gas

8.2. Metales en forma maciza

9. CASOS ESPECIALES: Preparados

9.1. Preparados gaseosos (mezclas de gases)

9.2. Aleaciones, preparaciones que contengan polimeros y preparaciones que contengan elastómeros

9.3. Peróxidos orgánicos

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. El objetivo de la clasificación es identificar todas las propiedades físico-químicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de sustancias y las propiedades físico-químicas y toxicológicas de preparados cuyo uso o manipulación en condiciones normales pueda constituir un riesgo. Una vez identificadas todas las propiedades de peligrosidad, debe etiquetarse la sustancia o el preparado indicando en que consiste el riesgo, con el fin de proteger al usuario, al público en general y al medio ambiente.

1.2. El presente Anexo establece los principios generales de clasificación y etiquetado de las sustancias y preparados. La información que en él se recoge tiene por objeto dar a conocer a todos los interesados (fabricantes, importadores y autoridades nacionales) los métodos de clasificación y etiquetado de las sustancias y preparados peligrosos.

1.3. Las disposiciones sobre clasificación y etiquetado de sustancias y preparados peligrosos tienen como fin ofrecer a los trabajadores y al público en general una información básica sobre los mismos. La etiqueta

advierte a las personas que utilizan o manipulan tales sustancias o preparados de los riesgos inherentes a ellos.

- Además, la etiqueta también puede hacer referencia, de modo más general, a las medidas de precaución que deben tomarse al emplear el producto si éste se suministra con una presentación diferente.

1.4. El contenido de la etiqueta advierte de todos los riesgos potenciales que puede entrañar la manipulación y utilización normal de las sustancias y preparados peligrosos en el estado en que se comercialicen, pero no necesariamente en el estado en que finalmente se utilizan (por ejemplo, diluidos). Los riesgos más graves se señalan mediante símbolos; estos riesgos, así como los que se derivan de otras propiedades peligrosas, se especifican mediante frases tipo indicativas de riesgo, mientras que las frases tipo relativas a los consejos de prudencia contienen recomendaciones de seguridad.

En el caso de las sustancias, la información se completa con el nombre de la misma, de acuerdo con una nomenclatura química reconocida internacionalmente; con preferencia se usará uno de los nombres del Inventario Europeo de Sustancias Químicas Existentes Comercializadas (EINECS) o la Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas (ELINCS), el número CEE y el nombre, dirección y teléfono de la persona establecida en el Mercado Interior que sea responsable de la comercialización de la sustancia.

En el caso de los preparados, se añade el nombre o la marca comercial del preparado, el nombre químico de las sustancias que componen el preparado y el nombre, dirección y teléfono de la persona establecida en el Mercado Interior responsable de su comercialización.

1.5 El artículo 5.5 de este Reglamento dispone que los fabricantes, distribuidores e importadores de sustancias peligrosas enumeradas en el EINECS pero que no se hayan incluido en el Anexo I deberán llevar a cabo investigaciones con el fin de conocer los datos pertinentes y accesibles que existan con relación a loas propiedades de dichas sustancias. Atendiendo a tal información, deberán envasar y etiquetar dichas sustancias con arreglo a las normas de los artículos 18 a 21 y a los criterios establecidos en el Anexo VI.

1.6. Los datos necesarios para efectuar la clasificación y etiquetado de las sustancias podrán obtenerse:

a) En cuanto a las sustancias para las que sea imprescindible mencionar las indicaciones especificadas en el Anexo VII, la mayor parte de los datos necesarios para su clasificación y etiquetado figurarán en el "expediente de base". Ambos, clasificación y etiquetado, se revisarán, si fuera necesario, cuando se disponga de información complementaria (Anexo VIII).

b) En cuanto a las otras sustancias (por ejemplo, las incluidas en el EINECS, pero que no se hayan incluido todavía en el Anexo I), los datos necesarios para su clasificación y etiquetado podrán obtenerse de un determinado número de fuentes distintas, tales como resultados de ensayos anteriores, indicaciones exigidas por la Reglamentación Internacional de transporte de Mercancías Peligrosas, información recogida en trabajos de referencia y en bibliografía o información generada por la experiencia práctica.

En lo que se refiere a los preparados se pueden obtener los datos necesarios para su clasificación y etiquetado:

a) En cuanto a los datos físico-químicos, aplicando los métodos contemplados en el Anexo V del presente Reglamento.
Para los preparados gaseosos se puede utilizar un método de cálculo para determinar las propiedades comburentes e inflamables (véase el Capítulo 9).

b) En cuanto a los datos sobre los efectos en la salud:
- aplicando los método contemplados en el Anejo V del presente Reglamento o los métodos convencionales que se indican en los puntos 1 al 9 del artículo 3.5 del Reglamento de preparados peligrosos.

- Sin embargo, si se refiere a la evaluación de las propiedades carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción, se aplicará el método convencional que se indica en los puntos 10 a 16 del artículo 3.5 del Reglamento de preparados peligrosos.

Nota referente a los resultados de los ensayos con animales.

La realización de ensayos con animales para obtener datos experimentales está sujeto a lo dispuesto en el Real Decreto 223/1988, de 14 de Marzo relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación.

1.7. Aplicación de los criterios orientativos de la guía.

Para la clasificación se tendrán en cuenta las propiedades toxicológicas, físico-químicas de las sustancias y preparados, además de las propiedades ecotoxicológicas de las sustancias.

La clasificación de los preparados y las sustancias se ajustará a los criterios recogidos en los Capítulos 2 a 4 y, en el caso de las sustancias, además en el Capítulo 5 del presente Anexo. Deberán considerarse todos los tipos de riesgo. Por ejemplo, la clasificación efectuada según 3.2.1 no quiere decir que se puedan ignorar otras secciones, como 3.2.2 o 3.2.4.

La selección del símbolo o símbolos y frases de riesgo se ajustará a la clasificación para que quede garantizada la expresión en la etiqueta de la naturaleza específica de los peligros potenciales señalados en la clasificación.

Sin perjuicio de los criterios indicados en los capítulos 2.2.2., 2.2.4. y 2.2.5., las sustancias y preparados que se encuentran en forma de aerosoles deberán atenerse a los criterios de inflamabilidad dispuestos en los puntos 1.8. y 2.2., c) del Anexo del Real Decreto 472/1988, de 30 de Marzo.

1.7.1. Definiciones.

Por "sustancias" se entenderán los elementos químicos y sus compuestos en estado natural o los obtenidos mediante cualquier procedimiento de producción, incluidos los aditivos necesarios para conservar la estabilidad del producto y las impurezas que resulten del procedimiento utilizado y excluidos los disolventes que puedan separarse sin afectar la estabilidad ni modificar la composición.

Una sustancia podrá estar bien definida químicamente (por ej., acetona) o bien podrá consistir en una mezcla compleja de constituyentes de composición variable (por ej., productos aromáticos destilados). En el caso de ciertas sustancias complejas, se han señalado algunos constituyentes determinados.

Por "preparados"se entenderán las mezclas o soluciones compuestas por dos o más sustancias.

1.7.2. Aplicación de los criterios de la guía a las sustancias:

Los criterios establecidos en el presente Anexo serán directamente aplicables cuando los datos se hayan obtenido utilizando métodos de ensayo equivalentes a los descritos en el Anexo V. En otros casos, los datos disponibles deberán evaluarse comparando los métodos de ensayo de que se trate con los métodos contemplados en el Anexo V y con las normas previstas en el presente Anexo, a fin de determinar la clasificación y etiquetado más adecuados.

1.7.2.1. Clasificación de las sustancias que contengan impurezas, aditivos o determinados constituyentes

Cuando se hayan señalado impurezas, aditivos o determinados constituyentes de las sustancias, se tendrán en cuenta si sus concentraciones sobrepasan los límites especificados de concentración:

- 0,1% si se trata de sustancias clasificadas como muy tóxicas, tóxicas, carcinogénicas (categoría 1 o 2), mutagénicas (categoría 1 o 2) o tóxicas para la reproducción (categoría 1 o 2)

- 1% si se trata de sustancias clasificadas como nocivas, corrosivas, irritantes, sensibilizantes, carcinogénicas de categoría 3, mutagénicas de categoría 3 o tóxicas para la reproducción categoría 3.

salvo que se especifiquen valores inferiores en el Anexo I del presente Reglamento.

A excepción de las sustancias incluidas específicamente en el Anexo I, la clasificación según las propiedades físico-químicas y según los riesgos para la salud se realizará con arreglo a lo dispuesto en el Artículo 3 y el etiquetado se ajustará a lo dispuesto en el Artículo 7 del Reglamento de preparados peligrosos.

La clasificación para propiedades físico-químicas se llevará a cabo según los criterios del capítulo 2, según los efectos peligrosos para el medio ambiente se realizará con arreglo a los criterios del Capítulo 5 del presente Anexo.

En el caso del amianto (650-013-00-6), esta regla general no se aplicará hasta que no se fije un límite de concentración en el Anexo I. Las sustancias que contengan amianto se clasificarán y etiquetarán conforme a los principios del artículo 5.5 de este Reglamento.

1.7.3. Aplicación de los criterios de la guía a los preparados.

Los criterios previstos en el presente Anexo serán directamente aplicables cuando los datos se hayan obtenido utilizando métodos de ensayo equivalentes a los descritos en el Anexo V, excepto los del Capítulo 4, a los que sólo se puede aplicar el método convencional. En otros casos, los datos deberán evaluarse comparando los métodos de ensayo empleados con los contemplados en el Anexo V y con las normas previstas en el presente Anexo, a fin de determinar la clasificación y etiquetado más adecuados.

Para evaluar los peligros para la salud según el método convencional a que se refiere el apartado 5 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos, los límites de concentración que deben utilizarse serán los fijados en:

- el Anexo I del presente Reglamento, o
- el Anexo I del Reglamento de preparados peligrosos, cuando la sustancia o sustancias no figuren en el Anexo I anterior o figuren sin indicar los límites de concentración.

En los preparados que contengan mezclas de gases, la clasificación con respecto a los efectos sobre la salud se efectuará según un método de cálculo basado en los límites de concentración individual que figuran en el Anexo I de esta disposición, o en caso de que no estén indicados en dicho Anexo, según los criterios establecidos en el Anexo I del Reglamento de preparados peligrosos.

1.7.3.1. Preparados o sustancias descritas en la sección 1.7.2.1. que se utilicen como componentes de otro preparado

Su etiquetado deberá estar de acuerdo con lo dispuesto en el Artículo 7 y según lo previsto en el Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos. No obstante, en determinados casos, la información que figura en la etiqueta del preparado o sustancia descrita en la sección 1.7.2.1 no es suficiente para que los fabricantes que lo utilicen como componente de otro (s) preparado (s) puedan efectuar correctamente la clasificación y etiquetado de este último (s).

En tal caso, la persona establecida en el Mercado Interior responsable de la comercialización del preparado inicial o sustancia descrita en la sección 1.7.2.1 ya sea el fabricante, importador o distribuidor proporcionará, previa petición justificada y a la mayor brevedad posible, todos los datos relativos a las sustancias peligrosas que contiene el preparado necesarios para clasificar y etiquetar correctamente el nuevo preparado. Estos datos también son necesarios para que los responsables de la comercialización del nuevo preparado puedan cumplir los requisitos del Reglamento de preparados peligrosos.

2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS SEGÚN SUS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

2.1. Introducción

Los métodos de ensayo relativos a las propiedades explosivas, comburentes e inflamables, que figuran en el Anexo V del presente Reglamento, sirven para dar un significado específico a las definiciones generales recogidas en los puntos a) a e) del apartado 2 del Artículo 2. Los criterios se regirán directamente por los métodos de ensayo descritos en el Anexo V, en la medida en que estén contemplados en el mismo.

Si existe información fiable según la cual, en la práctica, las propiedades fisicoquímicas de las sustancias y preparados (excepto los peróxidos orgánicos) difieren de las que revelan los métodos de ensayo descritos en el Anexo V, dichas sustancias y preparados se deberán clasificar en función del riesgo que podrían representar para las personas que los manipulen o para otras personas.

2.2. Criterios de clasificación, elección de los símbolos e indicaciones de peligro y elección de frases de riesgo.

En el caso de los preparados, deberán tenerse en cuenta los criterios a que se refiere el párrafo 2 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos.

2.2.1. Sustancias y preparados explosivos.

Las sustancias y preparados se clasificarán como explosivos y se les asignará el símbolo "E" y la indicación de peligro "explosivo", en función de los resultados de los ensayos a que se refiere el Anexo V, y en la medida en que las sustancias y los preparados sean explosivos en la forma en que se comercialicen. Es obligatorio incluir una frase de riesgo; su selección se basará en lo siguiente:

R2 Riesgo de explosión por choque, fricción, fuego u otras fuentes de ignición.

- Sustancias y preparados, excepto los establecidos a continuación.

R3 Alto riesgo de explosión por choque, fricción, fuego u otras fuentes de ignición

- Sustancias y preparados especialmente sensibles, tales como las sales del ácido pícrico y el tetranitrato de pentaeritritol (Pentrita).

2.2.2 Sustancias y preparados comburentes.

Las sustancias y preparados se clasificarán como comburentes y se les asignará el símbolo "O" y la indicación de peligro "comburente" en función de los resultados de los ensayos a que se refiere el Anexo V. Es obligatoria la inclusión de una frase de riesgo; su selección se basará en los resultados de los ensayos, teniendo en cuenta lo siguiente:

R7 Puede provocar incendios

- Peróxidos orgánicos con propiedades inflamables incluso aunque no estén en contacto con otros materiales combustibles.

R8 Peligro de fuego en contacto con materias combustibles

- Otras sustancias y preparados comburentes, incluidos los peróxidos inorgánicos, que puedan inflamarse o puedan aumentar el riesgo de inflamabilidad al mezclarse con materias combustibles.

R9 Peligro de explosión al mezclar con materias combustibles

- Otras sustancias y preparados, incluidos los peróxidos inorgánicos, que se vuelvan explosivos al mezclarse con materias combustibles como, por ejemplo, ciertos cloratos.

2.2.2.1 Observaciones sobre los peróxidos.

Respecto a las propiedades comburentes, los métodos actuales del Anexo V no pueden aplicarse a los peróxidos orgánicos.

Los peróxidos orgánicos, si se trata de sustancias, se clasificarán como comburentes en función de su estructura (p. ej., R-O-O-H; R1-O-O-R2).

Los preparados se clasificarán con el método de cálculo basado en la presencia de oxígeno activo y que se recoge en la sección 9.3.

Todo peróxido orgánico o preparado que lo contenga se clasificará como comburente si el peróxido o su formulación contiene:

- más del 5% de peróxidos orgánicos o más del 0,5% de oxígeno disponible procedente de los peróxidos orgánicos, y no más del 5% de peróxido de hidrógeno.

2.2.3 Sustancias y preparados extremadamente inflamables

Las sustancias y preparados se clasificarán como extremadamente inflamables y se les asignará el símbolo "F+" y la indicación de peligro, "extremadamente inflamable", en función de los resultados de los ensayos a que se refiere el Anexo V. Se seleccionará la frase de riesgo según los criterios siguientes:

R12 Extremadamente inflamable

- Sustancias y preparados líquidos cuyo punto de inflamación sea inferior a 0°C y su punto de ebullición (o en el intervalo de ebullición, la temperatura inicial de ebullición) sea inferior o igual a 35°C.

- Sustancias y preparados gaseosos que sean inflamables en contacto con el aire a temperatura y presión normales.

2.2.4 Sustancias y preparados fácilmente inflamables

Las sustancias y preparados se clasificarán como fácilmente inflamables y se les asignará el símbolo "F" y la indicación de peligro "fácilmente inflamable" en función de los resultados de los ensayos a que se refiere el Anexo V. Se les asignarán las frases de riesgo según los criterios siguientes:

R11 Fácilmente inflamable

- Sustancias y preparados sólidos, susceptibles de inflamarse fácilmente después de un breve contacto con una fuente de ignición y que continúan ardiendo o consumiéndose después de la eliminación de dicha fuente.

- Sustancias y preparados líquidos cuyo punto de inflamación sea inferior a 21° C, pero que no sean extremadamente inflamables.

R15 En contacto con el agua libera gases extremadamente inflamables

- Sustancias y preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, desprenden gases extremadamente inflamables en cantidades peligrosas a razón de 1 l/Kg/h, como mínimo.

R17 Se inflama espontáneamente en contacto con el aire

- Sustancias y preparados susceptibles de calentarse y, finalmente, inflamarse en contacto con el aire a la temperatura ambiente, sin aporte de energía.

2.2.5 Sustancias y preparados inflamables

Las sustancias y preparados se clasificarán como inflamables en función de los resultados de los ensayos a que se refiere el Anexo V. La frase de riesgo se asignará según los criterios siguientes:

R10 Inflamable

- Sustancias y preparados líquidos cuyo punto de inflamación sea igual o superior a 21° C, e inferior o igual a 55° C.

No obstante, en la práctica se ha demostrado que los preparados que tengan un punto de inflamación igual o superior a 21° C e inferior o igual a 55° C no tendrán que clasificarse como inflamables si el preparado no puede, en ningún caso, favorecer la combustión y si, además, no existe ningún riesgo para las personas que los manipulen ni para otras personas.

2.2.6 **Otras propiedades fisicoquímicas**

Se asignarán frases complementarias de riesgo a las sustancias y preparados clasificados de conformidad con los puntos 2.2.1 a 2.2.5 anteriormente citados o de conformidad con los Capítulos 3, 4 y 5 que se citan a continuación, aplicando los criterios siguientes (sobre la base de la experiencia adquirida en la aplicación del Anexo I):

R1 Explosivo

- Sustancias y preparados explosivos comercializados en solución o en forma húmeda, por ejemplo, la nitrocelulosa que contenga más de 12,6% de nitrógeno.

R4 Forma compuestos metálicos explosivos muy sensibles

- Sustancias y preparados que puedan originar derivados metálicos explosivos sensibles, por ejemplo, el ácido pícrico el ácido estífnico.

R5 Peligro de explosión en caso de calentamiento

- Sustancias y preparados inestables al calor, no clasificados como explosivos; por ejemplo, el ácido perclórico > 50%

R6 Peligro de explosión en contacto o sin contacto con el aire

- Sustancias y preparados inestables a temperatura ambiente, por ejemplo, el acetileno.

R7 Puede provocar incendio

- Sustancias y preparados reactivos, por ejemplo, el flúor, el hidrosulfito de sodio.

R14 Reacciona violentamente con el agua

- Sustancias y preparados que reaccionan violentamente con el agua, por ejemplo, el cloruro de acetilo, los metales alcalinos, el tetracloruro de titanio.

R16 Puede explosionar en mezcla con sustancias comburentes

- Sustancias y preparados que reaccionan de forma explosiva en presencia de agentes comburentes, por ejemplo, el fósforo rojo.

R18 Al usarlo, pueden formarse mezclas aire-vapor explosivas/inflamables

- Sustancias y preparados no clasificados como inflamables pero que contienen compuestos volátiles inflamables en el aire.

R19 Puede formar peróxidos explosivos

- Sustancias y preparados que puedan formar peróxidos explosivos durante su almacenamiento, por ejemplo el éter dietílico y el 1,4-dioxano.

R30 Puede inflamarse fácilmente al usarlo

- Preparados no clasificados como inflamables pero que pueden convertirse en inflamables por pérdida de componentes volátiles no inflamables.

R44 Riesgo de explosión al calentarlo en ambiente confinado

- Se aplica a las sustancias y preparados que no se han clasificado como explosivos según el punto 2.2.1, pero que, no obstante, en la práctica, pueden adquirir propiedades explosivas si se calientan en un recipiente cerrado. Así, por ejemplo, determinadas sustancias que se descompondrían de una forma explosiva si se calentaran en un recipiente de acero no reaccionarían de la misma forma que al calentarlas en recipientes menos rígidos.

Consúltese la sección 3.2.7 para otras frases indicadoras de riesgo

3. CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS PROPIEDADES TOXICOLOGICAS

3.1. Introducción

3.1.1. La clasificación se basa tanto en los efectos agudos como a largo plazo que producen sustancias y preparados a consecuencia de una sola exposición o de exposiciones repetidas o prolongadas.

Si se demuestra en la práctica que los efectos tóxicos de las sustancias y preparados en el hombre son, o podrían ser, distintos de los efectos observados mediante los experimentos con animales, o aplicando el método convencional señalado en el apartado 5 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos, las sustancias y preparados se clasificarán en función de su toxicidad para el hombre. No obstante, no es recomendable realizar experimentos con seres humanos y, en general no deberán efectuarse para contrastar resultados que han sido positivos en animales.

3.1.2. La clasificación de las sustancias se realizará conforme a los datos experimentales de que se disponga y aplicando unos criterios que tengan en cuenta la magnitud de tales efectos, detallados a continuación:

a) en caso de toxicidad aguda (efectos letales e irreversibles a consecuencia de una sola exposición), los criterios de los apartados 3.2.1. a 3.2.3;

b) en caso de toxicidad subaguda, subcrónica o crónica, los criterios de los apartados 3.2.2 a 3.2.4;

c) en caso de efectos corrosivos e irritantes, los criterios de los apartados 3.2.5 y 3.2.6;

d) en caso de efectos sensibilizantes, los criterios del apartado 3.2.7;

e) en caso de efectos específicos para la salud (carcinogénicos, mutagénicos y tóxicos para la reproducción), los criterios del Capítulo 4.

3.1.3 La clasificación de los preparados en función de los peligros relativos a la salud se efectuará del siguiente modo:

a) si no hay datos experimentales, según método convencional señalado en el apartado 5 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos. En este caso, la clasificación se basará en los límites de concentración individual extraídos de:

- el Anexo I del presente Reglamento,

- el Anexo I del Reglamento de preparados peligrosos, cuando la sustancia o sustancias no figuren en el Anexo I de este Reglamento o figuren sin indicar límites de concentración.

b) si se dispone de datos experimentales, según los criterios descritos en el punto 3.1.2, a excepción de las propiedades carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción conforme al método convencional a que se refieren los puntos 10 a 16 del apartado 5 del artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos.

3.1.4 Cuando la clasificación deba basarse en los resultados obtenidos a partir de experimentos con animales, dichos resultados se considerarán válidos para el hombre en la medida en que los ensayos reflejen de modo adecuado los riesgos para el mismo.

3.1.5. La toxicidad oral aguda de las sustancias o preparados comercializados puede determinarse bien mediante un método que permita la evaluación del valor DL_{50} o bien estableciendo las dosis discriminante (procediendo de la dosis fija).

La dosis discriminante es la dosis que produce toxicidad evidente pero sin mortalidad, y debe ser uno de los cuatro niveles de administración especificados en el Anexo V (5, 50, 500 o 2000 mg por Kg de peso corporal).

El concepto de "toxicidad evidente" se utiliza para designar los efectos tóxicos, producidos tras la exposición a la sustancia estudiada, que sean tan graves que la exposición a la dosis fija inmediatamente superior pueda suponer la muerte.

Los resultados del ensayo con una dosis concreta pueden ser:

- menos del 100% de supervivencia
- 100% de supervivencia, con toxicidad evidente
- 100% de supervivencia, sin toxicidad evidente.

El método de ensayo exige a veces estudiar dosis mayores o menores, si no se estudia antes el nivel de dosis correspondiente. Referirse también al cuadro de evaluación del método B1 bis del Anexo V.

En los criterios de las secciones 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3 sólo se recogen los resultados de la prueba final. La dosis de 2000 mg/kg debe utilizarse principalmente para obtener información sobre los efectos tóxicos de las sustancias que poseen baja toxicidad aguda y que no se clasifican por la toxicidad aguda.

3.2. Criterios de clasificación, elección de los símbolos e indicaciones de peligro y elección de las frases de riesgo

3.2.1 Sustancias y preparados muy tóxicos.

Las sustancias y preparados se clasificarán como muy tóxicos y se les asignará el símbolo "T+" y la indicación de peligro, "muy tóxico", siguiendo los criterios como se especifica a continuación. Las frases indicadoras de riesgos específicos se asignarán en función de los criterios siguientes:

R28 Muy tóxico por ingestión

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por vía oral en rata: $\leq$ 25 mg/kg.

- menos del 100% de supervivencia a 5 mg/kg, vía oral, en rata, por el procedimiento de la dosis fija.

R27 Muy tóxico en contacto con la piel

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por penetración cutánea en rata o en conejo: $\leq$ 50 mg/kg.

R26 Muy tóxico por inhalación.

Toxicidad aguda:

- CL_{50} por inhalación en rata para aerosoles o partículas: $\leq$ 0.25 mg/l/4h
- CL_{50} por inhalación en rata para gases y vapores: $\leq$ 0,5 mg/l/4 h.

R39 Peligro de efectos irreversibles muy graves

- Pruebas convincentes de que estos daños irreversibles, distintos de los efectos mencionados en el Capítulo 4, pueden ser provocados por una única exposición por una vía de administración adecuada, generalmente en el intervalo de valores antes citados.

Para indicar la vía de administración/exposición se asignará una de las siguientes combinaciones: R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/27/28, R39/26/27/28.

3.2.2 Sustancias y preparados tóxicos

Las sustancias y preparados se clasificarán como tóxicos y se les asignará el símbolo "T" y la indicación de peligro, "tóxico", siguiendo los criterios siguientes:

R25 Tóxico por ingestión

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por vía oral en rata: 25 < DL_{50} $\leq$ 200 mg/kg.

- Dosis discriminante por vía oral en rata: 5 mg/kg: 100% de supervivencia con toxicidad manifiesta.

R24 Tóxico en contacto con la piel

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por penetración cutánea en rata o en conejo: 50 < DL_{50} $\leq$ 400 mg/kg.

R23 Tóxico por inhalación

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por inhalación en ratas para aerosoles o partículas: 0,25 < CL_{50} $\leq$ 1 mg/l/4h

- CL_{50} por inhalación en rata para gases y vapores: 0,5 < CL_{50} $\leq$ 2 mg/l/4h.

R39 Peligro de efectos irreversibles muy graves

- Pruebas convincentes de que estos daños irreversibles, distintos de los efectos mencionados en el Capítulo 4, pueden ser provocados por una única exposición por una vía de administración adecuada, generalmente en la gama de dosis citada anteriormente.

Para indicar la vía de administración/exposición se les asignará una de las siguientes combinaciones: R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R39/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

R48 Riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada

- Puede producir lesiones graves (trastornos funcionales o cambios morfológicos con importancia toxicológica) como consecuencia de una exposición repetida o prolongada, por una vía de administración adecuada.

Las sustancias y los preparados se clasificarán por lo menos como "tóxicas" cuando se observen estos efectos en niveles de un orden de magnitud inferior (es decir, diez veces menos) a los establecidos en la sección 3.2.3 para la R48.

Para indicar la vía de administración/exposición se les asignará una de las siguientes combinaciones: R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/24/25, R48/23/24/25.

3.2.3 Sustancias y preparados nocivos

Las sustancias y preparados se clasificarán como nocivos y se les asignará el símbolo "Xn" y la indicación de peligro, "nocivo", siguiendo los

criterios como se especifica a continuación. Se asignarán las frases de riesgos según los criterios siguientes:

R22 Nocivo por ingestión

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por vía oral en rata: $200 \leq DL_{50} < 2000$ mg/kg.

- Dosis discriminante por vía oral en rata: 50 mg/kg: 100% de supervivencia con toxicidad evidente.

- Supervivencia menor de 100% a 500 mg/kg por vía oral en rata utilizado el procedimiento de dosis fija, referida a la tabla de evaluación en el método de ensayo B1 bis del Anexo V.

R21 Nocivo en contacto con la piel

Toxicidad aguda:

- DL_{50} por penetración cutánea en rata o conejo: $400 < DL_{50} \leq 2000$ mg/kg.

R20 Nocivo por inhalación

Toxicidad aguda:

- CL_{50} por inhalación en rata para aerosoles o partículas: $1 < CL_{50} \leq 5$ mg/l/4h

- CL_{50} por inhalación en rata, para gases y vapores: $2 < CL_{50} \leq 20$ mg/l/4h.

R40 Posibilidad de efectos irreversibles

- Pruebas convincentes de que estos daños irreversibles, distintos de los efectos mencionados en el Capítulo 4, pueden ser provocados por una única exposición por una vía de administración adecuada, generalmente en la gama de dosis antes citada.

Para indicar la vía de administración/exposición se les asignará una de las siguientes combinaciones: R40/20, R40/21, R40/22, R40/20/21, R40/20/22, R40/21/22, R40/20/21/22.

R48 Riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada

- Una exposición repetida o prolongada por una vía adecuada puede producir lesiones graves (trastornos funcionales o cambios morfológicos de importancia toxicológica).

Las sustancias y los preparados se clasificarán por lo menos como "nocivas" cuando estos efectos se observen con dosis del orden de:

- vía oral en rata: $\leq$ 50 mg/kg (peso corporal)/día
- penetración cutánea en rata o conejo: $\leq$ 100 mg/kg (peso corporal)/día

- por inhalación en rata: $\leq$ 0,25 mg/l/6 h/día

Estos valores orientativos se pueden aplicar directamente cuando se hayan comprobado lesiones graves en el transcurso de un estudio de toxicidad subcrónica (90 días). Con los estudios de toxicidad aguda (28 días), las cifras deberán aumentarse en un factor de 3 aproximadamente. Si se puede disponer de un estudio de toxicidad crónica (dos años), los resultados se evaluarán caso por caso. Cuando se disponga de estudios de más de un período de tiempo, se tomarán en consideración por lo general los resultados de los estudios de mayor duración.

Para indicar la vía de administración/exposición se les asignará una de las siguientes combinaciones: R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

3.2.3.1 Comentarios concernientes a las sustancias muy volátiles

En el caso de ciertas sustancias con una elevada concentración de vapor saturado, puede haber indicios de efectos preocupantes. Tales sustancias pueden no estar clasificadas según los criterios de efectos para la salud recogidos en esta guía (3.2.3). Sin embargo, si hay indicios adecuados de que tales sustancias pueden representar un riesgo cuando se utilicen y manipulen normalmente, podrá ser necesario clasificados como "nocivas" con una frase adecuada, según cada caso concreto.

Estas sustancias se clasificarán en el Anexo I con límites adecuados de concentración.

3.2.4 Observaciones con respecto a la R48

El uso de esta frase de riesgo se refiere a la gama específica de efectos biológicos que se describen a continuación. Para aplicar la R48 es necesario considerar que los efectos graves para la salud incluyen la muerte, trastornos funcionales graves o cambios morfológicos de importancia toxicológica. Es especialmente importante que los cambios sean irreversibles. No sólo hay que tener en cuenta los cambios específicos profundos que afecten a un solo órgano o sistema, sino también los cambios de menor importancia, pero generalizados, que afecten a diversos órganos, o los cambios profundos en el estado general de salud.

A la hora de evaluar la existencia de estos efectos, deben tenerse en cuenta las siguientes directrices:

1. Pruebas que indiquen que debe aplicarse la R48:
   a) Muerte provocada por la sustancia

   b) i) Cambios funcionales profundos en el sistema nervioso central o periférico, incluidos vista, oído y olfato, que se evaluarán por medio de exámenes clínicos u otros métodos adecuados (por ejemplo, electrofisiología).

      ii) Cambios funcionales profundos en otros sistemas orgánicos (por ejemplo, el pulmón).

   c) Cualquier cambio constante en los parámetros de análisis de orina, hematología o bioquímica clínica que indique una disfunción orgánica grave. Tienen especial importancia los trastornos hematológicos si de las pruebas se desprende que pueden reducir la producción medular de células sanguíneas.

   d) Daños orgánicos graves apreciados en el examen microscópico de la autopsia.

      i) Necrosis profunda o extendida, fibrosis o formación de granulomas en órganos vitales con capacidad regenerativa (p.ej., el hígado)

      ii) Cambios morfológicos profundos potencialmente reversibles pero que demuestren claramente la existencia de una disfunción orgánica acusada (por ejemplo, degeneración grasa en el hígado, nefrosis tubular aguda del riñón, gastritis ulcerosa)

      iii) Evidencias de muerte celular apreciable en órganos vitales sin capacidad regenerativa (por ejemplo, fibrosis del miocardio o degeneración retrógrada de un nervio) o en poblaciones de celular primordiales (por ejemplo, aplasia o hipoplasia de la médula ósea).

Los datos anteriores se obtendrán por lo general a partir de experimentos con animales. Cuando se analicen datos procedentes de la experiencia práctica habrá de prestarse especial atención a los niveles de exposición.

2. Pruebas que indiquen que no debe aplicarse la R48

La R48 está restringida a "efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada". No obstante, se pueden observar en seres humanos y animales una serie de efectos asociados a las sustancias que no justifican el uso de la R48, pero que tienen importancia cuando se intenta determinar el nivel en que una sustancia química no produce ningún efecto. Entre los ejemplos de cambios demostrados que, por regla general, no justificarían la asignación de la R48 a una sustancia -independientemente de su importancia estadística- se pueden mencionar:

a) Apreciación clínica de cambios en el aumento de peso corporal, o en el consumo de alimentos o agua, que puedan tener importancia toxicológica sin dar lugar por ello a "efectos graves".

b) Ligeros cambios en los parámetros de análisis urinario, hematología o bioquímica clínica que sean dudosos o que presenten una importancia mínima desde el punto de vista toxicológico.

c) Cambios en el peso de los órganos sin que haya pruebas de disfunción orgánica.

d) Respuestas adaptativas (p. ej.: migración de macrófagos a los pulmones, hipertrofia hepática e inducción enzimática, respuestas hiperplásicas a las sustancias irritantes). A

una sustancia que tenga efectos locales en la piel al ser aplicada repetidamente se le atribuirá preferiblemente la R38: "irrita la piel".

e) En los casos en que se haya demostrado que existe un mecanismo tóxico específico de especie (por ejemplo, por vías metabólicas específicas).

3.2.5 Sustancias y preparados corrosivos

Se considera que una sustancia o un preparado son corrosivos si, al aplicarlos sobre la piel intacta y sana de un animal, destruyen los tejidos en todo el espesor de la piel de por lo menos un animal, durante el ensayo de irritación cutánea citado en el Anexo V o con un método equivalente, o si dicho resultado fuera previsible, por ejemplo, tratándose de reacciones fuertemente alcalinas o ácidas (pH demostrado inferior o igual a 2 o bien superior o igual a 11,5. También se tendrá en cuenta la reserva ácida o alcalina).

La clasificación podrá basarse en los resultados de ensayos "in vitro" validados.

Las sustancias o preparados se clasificarán como "corrosivos" y se les asignará el símbolo "C" y la indicación de peligro, "corrosivo". Se les asignarán las frases de riesgo según los criterios siguientes:

R35 Provoca quemaduras graves

- Si, al aplicarlos sobre la piel intacta y sana de un animal, producen lesiones de los tejidos en todo el espesor de la piel después de un tiempo de exposición que no sobrepase los 3 minutos, o si dicho resultado fuera previsible.

R34 Provoca quemaduras

- Si, al aplicarlos sobre la piel intacta y sana de un animal, producen lesiones de los tejidos en todo el espesor de la piel después de un tiempo de exposición que no sobrepase las 4 horas, o si dicho resultado fuera previsible.
- Hidroperóxidos orgánicos, excepto cuando se demuestre lo contrario.

3.2.6 Sustancias y preparados irritantes

Las sustancias y preparados se clasificarán como "irritantes" y se les asignará el símbolo "Xi" y la indicación de peligro, "irritante", según los criterios siguientes:

3.2.6.1 Inflamación de la piel

Se asignarán las siguientes frases de riesgo conforme a los criterios:

R38 Irrita la piel

- Sustancias y preparados que producen una inflamación importante de la piel, la cual persiste al menos 24 horas tras un período de exposición que no sobrepase las cuatro horas, cuando se realiza la determinación con el conejo según el método de ensayo de irritación cutánea que figura en el Anexo V.

La inflamación de la piel se considerará importante si:

- el valor medio de los resultados de la formación de eritemas y escaras o bien de edema (valor calculado teniendo en cuenta todos los animales de ensayo) es igual o superior a 2,

- o bien, en caso de que el ensayo del Anexo V se hubiera realizado en tres animales, cuando se haya observado en dos o más animales la formación de eritemas y escaras o de edemas equivalentes a un valor medio igual o superior a 2, calculado por cada animal individualmente.

En ambos casos, al calcular los respectivos valores medios deberán utilizarse todos los resultados de cada uno de los periodos de lectura (24, 48 y 72 horas) para cada efecto.

La inflamación de la piel también se considerará importante si persiste en un mínimo de dos animales, al final del periodo de observación. También deberán tenerse en cuenta efectos especiales como, por ejemplo, hiperplasia, descamación, decoloración, formación de fisuras o costras o alopecia.

- Sustancias y preparados que producen una inflamación importante de la piel, comprobada en observaciones prácticas de seres humanos.
- Peróxidos orgánicos, excepto cuando se demuestre lo contrario.

Irritación debida a las propiedades desengrasantes de la sustancia

Cuando los resultados de las pruebas o la experiencia práctica revelen irritación según los criterios anteriores, se utilizarán frases R. Sin embargo, se utilizarán frases S cuando haya razones para suponer que las propiedades desengrasantes de la sustancia pueden causar irritación al hombre incluso aunque no se cumplan los criterios anteriores, o si se ha utilizado un ensayo inadecuado.

3.2.6.2 Lesiones oculares

Asimismo, se asignarán las siguientes frases de riesgo según los criterios indicados:

R36 Irrita los ojos

- Sustancias y preparados que, al aplicarse al ojo del animal, producen importantes lesiones oculares que aparecen en el plazo de 72 horas tras la exposición y que persisten durante al menos 24 horas.

Una lesión ocular se considerará importante si los valores medios de los resultados del ensayo de irritación ocular citado en el Anexo V son alguno de los siguientes:

- opacidad de la córnea: igual o superior a 2 pero inferior a 3;
- lesión del iris: igual o superior a 1 pero no superior a 1,5;
- enrojecimiento de la conjuntiva: igual o superior a 2,5;
- edema de la conjuntiva (quemosis): igual o superior a 2;

o bien, cuando se haya realizado el ensayo del Anexo V utilizando tres animales, si las lesiones de dos o más animales son equivalentes a alguno de estos valores, salvo para la lesión del iris, en cuyo caso el valor deberá ser igual o superior a 1 pero inferior a 2, y para el enrojecimiento de la conjuntiva, caso en que el valor deberá ser igual o superior a 2,5.

En ambos casos, al calcular los respectivos valores medios, deberán utilizarse todos los resultados de cada uno de los periodos de lectura (24, 28 y 72 horas) para cada efecto.

- Sustancias o preparados que puedan producir lesiones oculares importantes, comprobadas normalmente en la experiencia práctica con seres humanos.

- Peróxidos orgánicos, excepto cuando se demuestre lo contrario.

R41 Riesgo de lesiones oculares graves

- Sustancias y preparados que, al aplicarse al ojo del animal, producen graves lesiones oculares que ocurren durante 72 horas después de la aplicación y el mal persiste por lo menos 24 horas de la aplicación de la sustancia estudiada.

Las lesiones oculares se considerarán graves si la media de los resultados del ensayo de irritación ocular del Anexo V tiene alguno de los siguientes valores:

- opacidad de la córnea: igual o superior a 3;
- lesión del iris: superior a 1,5.

También se considerarán graves las lesiones, si el ensayo se realiza con tres animales, cuando dichas lesiones sean equivalentes, en dos animales o más, a alguno de los valores siguientes:

- opacidad de la córnea: igual o superior a 3;
- lesión del iris: igual a 2.

En ambos casos, al calcular los respectivos valores medios, deberán utilizarse todos los resultados de cada uno de los periodos de lectura (24, 48 y 72 horas) para cada efecto.

Las lesiones oculares también se considerarán graves si persisten al final del período de observación.

También se considerarán graves las lesiones oculares si la sustancia o preparado produce coloración irreversible de los ojos.

- Sustancias y preparados que producen lesiones oculares graves, comprobadas normalmente en la experiencia práctica con seres humanos.

Nota:

Cuando una sustancia o preparado esté clasificado como corrosivo y se le asigne la frase R34 o la R35, se considerará implícito el riesgo de lesión ocular grave y no se incluirá R41 en la etiqueta. Sin embargo, en el caso de los preparados al calcular la suma de los cocientes mediante las fórmulas indicadas en el punto 6*.b) y 8*.b) del apartado 5 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos, las sustancias clasificadas como corrosivas se tratarán como si se les hubiera asignado R41.

3.2.6.3 Irritación del sistema respiratorio

Se asignará la siguiente frase de riesgo según los criterios indicados:

R37 Irrita las vías respiratorias

- Sustancias y preparados que puedan producir una irritación grave del aparato respiratorio, basándose principalmente en observaciones en humanos.

3.2.7. Sustancias y preparados sensibilizantes

3.2.7.1. Sensibilización por inhalación

Las sustancias y preparados se clasificarán como "sensibilizantes" y recibirán el símbolo "Xn", la indicación de peligro "nocivo" y la frase de riesgo R42, según los criterios indicados a continuación:

R42 Posibilidad de sensibilización por inhalación

- Cuando existan pruebas de que dichas sustancias y preparados puedan provocar en el hombre una reacción de sensibilización por inhalación con una frecuencia superior a la que sería de esperar en la población en general.

- Si la sustancia es un isocianato, salvo que se demuestre que la sustancia no produce sensibilización por inhalación.

3.2.7.2. Sensibilización por contacto cutáneo

Las sustancias y preparados se clasificarán como sensibilizantes y recibirán el símbolo "Xi", la indicación de peligro "irritante" y la frase de riesgo R43, según los criterios indicados a construcción:

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel

- Si la experiencia demuestra que las sustancias y preparados pueden provocar una reacción de sensibilización al contacto con la piel en un número significativo de personas, o si dan un resultado positivo las experimentaciones realizadas en animales.

En el caso de ensayo para la sensibilización de la piel contemplado en el Anexo V o en el caso de otros métodos de ensayo auxiliares, se considerará positiva una respuesta que se produzca en al menos un 30% de los animales. En el caso de cualquier otro método de ensayo, se deberá considerar como positiva una respuesta como mínimo en el 15% de los animales.

3.2.7.3. Téngase en cuenta que, si se asignan el símbolo "Xn" y la indicación de peligro "nocivo", el símbolo "Xi" y la indicación de peligro "irritante" serán optativos.

3.2.8. Otras propiedades toxicológicas

Se asignarán otras frases de riesgo a las sustancias y preparados clasificados en virtud de los puntos 2.2.1 a 3.2.7 y/o capítulos 4 y 5 de acuerdo con los siguientes criterios (basados en la experiencia adquirida en la aplicación del Anexo I).

R29 En contacto con agua libera gases tóxicos

Sustancias y preparados que, en contacto con el agua o con el aire húmedo, liberan gases muy tóxicos/tóxicos en cantidades potencialmente peligrosas; por ejemplo, el fosfuro de aluminio, el pentasulfuro de fósforo.

R31 En contacto con ácidos libera gases tóxicos

Sustancias y preparados que reaccionan con ácidos desprendiendo gases tóxicos en cantidades peligrosas, por ejemplo, el hipoclorito de sodio o los polisulfuros de bario. En cuanto a las sustancias utilizadas por los consumidores en general, sería preferible utilizar la frase S50 (no mezclar con ... (a especificar por el fabricante)).

R32 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos

Sustancias y preparados que reaccionan con ácidos desprendiendo gases muy tóxicos en cantidades peligrosas; por ejemplo, las sales del ácido cianhídrico o la ácida sódica. En cuanto a las sustancias utilizadas por los consumidores en general, sería preferible utilizar la frase S50 (no mezclar con ... (a especificar por el fabricante)).

R33 Peligro de efectos acumulativos

Para las sustancias y preparados cuya acumulación en el cuerpo humano, aún siendo preocupante, no revista una importancia que justifique el uso de la frase R48.

R64 Puede perjudicar a los niños alimentados con leche materna

Sustancias y preparados absorbidos por mujeres y que pueden interferir con la lactancia o que pueden estar presentes (incluidos sus metabolitos) en la leche materna en cantidades suficientes para afectar a la salud del lactante.

Véase la sección 4.2.3.3 en relación con comentarios sobre la utilización de esta frase R (y, en ciertos casos, R33).

Consúltese el punto 2.2.6 para otras frases de riesgo suplementarios.

4. CLASIFICACION SEGUN SUS EFECTOS ESPECIFICOS SOBRE LA SALUD HUMANA

4.1. Introducción

4.1.1 Este Capítulo recoge el procedimiento de clasificación de las sustancias que puedan producir los efectos descritos a continuación.

4.1.2 Si un fabricante o su representante dispone de información según la cual una sustancia debe clasificarse y etiquetarse conforme a los criterios enunciados en los puntos 4.2.1., 4.2.2. o 4.2.3., etiquetará provisionalmente dicha sustancia con tales criterios, salvo si la aplicación de los criterios mencionados en los puntos 3.2.1. al 3.2.5. mostrara que se necesita una clasificación más estricta.

4.1.3 El fabricante o su representante remitirá a la Autoridad competente, en el plazo más breve posible, un documento que resuma toda la información referida a la sustancia. Dicho resumen debe contener una bibliografía con todas las referencias pertinentes y puede incluir, también cualquier información de interés, aunque no haya sido publicada.

4.1.4 Además, si el fabricante o su representante dispone de nuevos datos pertinentes para la clasificación o etiquetado de una sustancia, conforme a los criterios establecidos en los puntos 4.2.1., 4.2.2. o 4.2.3., los presentará a la Autoridad Competente, en el plazo más breve posible.

4.1.5 Con vistas a alcanzar lo antes posible una clasificación armonizada para el Mercado Interior, la Autoridad Competente que disponga de información, suministrada o no por el fabricante, que justifique la clasificación de una sustancia en una u otra de dichas categorías, deberá remitirla a la mayor brevedad a la Comisión, acompañada de una propuesta de clasificación y etiquetado.

La Comisión enviará a los otros Estados miembros la propuesta de clasificación y etiquetado que haya recibido. Cualquier Estado miembro puede solicitar a la Comisión que le comunique la información que obre en su poder.

Cualquier Estado miembro que, por razones concretas, estime inapropiados la clasificación y el etiquetado sugeridos, en lo que se refiere a los efectos carcinogénicos, mutagénicos o tóxicos para la reproducción, lo pondrá en conocimiento de la Comisión.

4.2. Criterios de clasificación, indicación de peligro y elección de las frases de riesgo

4.2.1 **Sustancias carcinogénicas**

En lo referente a la clasificación y el etiquetado, y habida cuenta del estado actual de los conocimientos, dichas sustancias se dividen en tres categorías:

Primera categoría

Sustancias que, se sabe, son carcinogénicas para el hombre. Se dispone de elementos suficientes para establecer la existencia de una relación de causa/efecto entre la exposición del hombre a tales sustancias y la aparición del cáncer.

Segunda categoría

Sustancias que pueden considerarse como carcinogénicas para el hombre. Se dispone de suficientes elementos para suponer que la exposición del hombre a tales sustancias puede producir cáncer. Dicha presunción se fundamenta generalmente en:

- estudios apropiados a largo plazo en animales,
- otro tipo de información pertinente.

Tercera categoría

Sustancias cuyos posibles efectos carcinogénicos en el hombre son preocupantes, pero de las que no se dispone de información suficiente para realizar una evaluación satisfactoria. Hay algunas pruebas procedentes de análisis con animales, pero que resultan insuficientes para incluirlas en la segunda categoría.

4.2.1.1. Se les asignarán las siguientes frases de riesgos específicos:

Primera y segunda categoría

T;R45 Puede causar cáncer

No obstante, en el caso de sustancias que presenten riesgo de carcinogénesis sólo al ser inhaladas, por ejemplo, en forma de polvo, vapor o humo (otras vías de exposición -por ejemplo, por ingestión o por contacto con la piel- no plantean riesgo de carcinogénesis) se empleará el siguiente símbolo y frase de riesgo específico:

T;R49 Puede causar cáncer por inhalación

Tercera categoría

Xn;R40 Posibilidad de efectos irreversibles

4.2.1.2. Observaciones con respecto a la clasificación de las sustancias carcinogénicas

Las sustancias se clasifican dentro de la primera categoría a partir de datos epidemiológicos; la clasificación dentro de la segunda y tercera categorías se basa en experimentos con animales.

Para que la sustancia se clasifique en la segunda categoría, como "carcinogénica", será necesario obtener resultados positivos en dos especies animales, o pruebas positivas contundentes en una especie, junto con pruebas complementarias, tales como datos de genotoxicidad, estudios metabólicos o bioquímicos, inducción de tumores benignos, relación estructural con otras sustancias carcinogénicas conocidas, o datos de estudios epidemiológicos que sugieran una relación.

La tercera categoría comprende dos subcategorías:

a) Sustancias sobre las que se ha investigado pero de las que no hay suficientes pruebas sobre la inducción de tumores para incluirlas en la segunda categoría, y no es probable que con más experimentos se pueda obtener la información necesaria para su clasificación.

b) Sustancias sobre las que no se ha investigado bastante. Los datos disponibles son inadecuados, pero preocupantes en relación con el hombre. La clasificación es provisional y se requieren más experimentos antes de adoptar una decisión definitiva.

Para distinguir entre la segunda y tercera categorías, se aplicarán los criterios enumerados a continuación. Estos criterios, especialmente cuando están combinados, en la mayoría de los casos darían como resultado la clasificación en la tercera categoría, aun cuando se hayan inducido tumores en los animales:

- Efectos carcinogénicos sólo con niveles de dosis muy elevados que excedan la "dosis máxima tolerada". Esta última se caracteriza por la aparición de efectos tóxicos que, si bien no reducen el periodo de vida, van acompañados de cambios físicos como, por ejemplo, un 10% de retraso en el aumento de peso;

- Aparición de tumores, especialmente en niveles altos de dosis, únicamente en órganos concretos de determinadas especies que son proclives a la formación espontánea de tumores;

- Ausencia de genotoxicidad en pruebas a corto plazo in vivo e in vitro;

- Existencia de un mecanismo de actuación secundario que, por encima de un cierto nivel de dosis, implica un nuevo umbral práctico (por ejemplo, efectos hormonales en órganos o en mecanismos de regulación fisiológica, estimulación crónica de la proliferación celular);

- Existencia de mecanismos específicos de especie para la formación de tumores (por ejemplo, a través de vías metabólicas específicas) que no afectan al hombre.

Para establecer la distinción entre la tercera categoría y los criterios de no clasificación, se tendrán en cuenta aquellos que excluyan los posibles efectos en el hombre.

- La sustancia no se clasificará en ninguna de las categorías en caso de que el mecanismo de formación experimental de tumores esté claramente identificado y existan pruebas contundentes de que el proceso no puede extrapolarse al hombre;

- La sustancia podrá no clasificarse en ninguna de las categorías en caso de que los únicos datos disponibles sean tumores hepáticos en ciertas variedades sensibles de ratones, sin que haya otro tipo de evidencia suplementaria;

- Se prestará especial atención a los casos en que los únicos datos disponibles sean la aparición de neoplasias en zonas o especies a las que se conoce por una gran incidencia de formaciones espontáneas.

4.2.2. Sustancias mutagénicas

4.2.2.1. A efectos de clasificación y etiquetado, y habida cuenta del estado actual de los conocimientos, dichas sustancias se dividen en tres categorías:

Primera categoría

Sustancias que, se sabe, son mutagénicas para el hombre.

Se dispone de pruebas suficientes para establecer una relación de causa/efecto entre la exposición del hombre a tales sustancias y la aparición de alteraciones genéticas hereditarias.

Segunda categoría

Sustancias que pueden considerarse como mutagénicas para el hombre.

Se dispone de suficientes elementos de juicio para suponer que la exposición del hombre a tales sustancias puede producir alteraciones genéticas hereditarias. Dicha presunción se basa generalmente en:

- estudios apropiados en animales,
- otro tipo de información pertinente.

Tercera categoría

Sustancias cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes. Los resultados obtenidos en estudios de mutagénesis apropiados son insuficientes para clasificar dichas sustancias en la segunda categoría.

4.2.2.2. Se les asignarán los siguientes símbolos y frases de riesgo:

Primera y segunda categoría:

T;R46 Puede causar alteraciones genéticas hereditarias

Tercera categoría:

Xn;R40 Posibilidad de efectos irreversibles

4.2.2.3 Observaciones con respecto a la clasificación de las sustancias mutagénicas

Definición de los términos:

Una mutación es un cambio permanente en la cantidad o la estructura del material genético de un organismo que produce un cambio de las características del fenotipo de dicho organismo. Las alteraciones pueden afectar a un solo gen, a un conjunto de genes o a un cromosoma entero. En un solo gen, los efectos pueden producirse a consecuencia de los efectos sobre las bases simples de ADN (mutaciones puntuales) o de grandes cambios en el gen (incluso pérdidas). Los efectos en cromosomas enteros pueden implicar cambios

estructurales o numéricos. Si la mutación se produce en células germinales de organismos con reproducción sexual, puede transmitirse a la descendencia. Un mutágeno es un agente que provoca un aumento de mutaciones.

Cabe señalar que las sustancias se clasifican como mutágenas con respecto a las malformaciones genéticas heredadas. No obstante, se considera que, por regla general, los resultados que implican la clasificación de los productos químicos en la tercera categoría ("inducción de cambios con incidencia genética en células somáticas") constituyen una advertencia de la posible existencia de carcinogénesis.

En la actualidad se están elaborando métodos para llevar a cabo ensayos de mutagenicidad. En muchos de los nuevos ensayos se emplean protocolos y criterios de evaluación no normalizados. A la hora de evaluar los datos sobre mutagenicidad ha de tenerse en cuenta la calidad de los ensayos y el grado de validación del método de ensayo.

Primera categoría

Para clasificar la sustancia en la primera categoría se necesitan pruebas positivas a partir de los estudios epidemiológicos de que se han producido mutaciones en el hombre. Hasta el momento no se conocen ejemplos de tales sustancias. Es evidente lo extremadamente difícil que resulta obtener datos fiables a partir de los estudios sobre la incidencia de las mutaciones en las poblaciones humanas, o sobre un posible aumento de su frecuencia.

Segunda categoría

Para clasificar la sustancia en la segunda categoría, se requieren resultados positivos que indiquen (a) efectos mutagénicos o (b) otro tipo de interacción celular que afecte a la mutagenicidad, obtenidos en células germinales de mamíferos "in vivo", o (c) efectos mutagénicos en células somáticas de mamíferos in vivo, junto con la demostración fehaciente de que la sustancia, o un metabolito relevante, alcanza las células germinales.

Con respecto a la clasificación en la segunda categoría, los métodos actuales más adecuados son:

2 a) Estudios de mutagenicidad en células germinales in vivo:
- ensayos de mutación local específica;
- ensayos de traslocación hereditaria;
- ensayos de mutación letal dominante.

Estudios que demuestran realmente si la descendencia ha resultado afectada o si existen malformaciones en el embrión en desarrollo.

2 b) Estudios in vivo que demuestren la interacción con los componentes de las células germinales (por lo general, ADN):

- detección de anormalidades cromosómicas -por ejemplo, análisis citogenéticos-, incluida la aneuploidía, causada por la segregación deficiente de cromosomas;
- ensayos de intercambio de cromátidas hermanas;
- ensayos de síntesis de ADN no programada;
- estudios de unión (covalente) del mutágeno al ADN de las células germinales;
- estudio de otras lesiones del ADN.

Estos estudios aportan pruebas de carácter más o menos indirecto. Los resultados positivos de estos ensayos por lo general se verán confirmados por los resultados positivos de otros ensayos de mutagenicidad en células somáticas in vivo, en mamíferos o en el hombre (véase la tercera categoría, con preferencia los métodos expuestos en 3a).

2 c) Estudios in vivo que demuestren los efectos mutagénicos en las células somáticas de los mamíferos (véase 3a), en combinación con métodos toxicocinéticos o de otro tipo que puedan demostrar que el compuesto, o un metabolito, alcanza las células germinales.

En los casos de 2b) y 2c), los resultados positivos de ensayos en los que interviene el huésped o la demostración de efectos inequívocos en los ensayos in vitro pueden considerarse pruebas de apoyo.

Tercera categoría

Para clasificar la sustancia en la tercera categoría, se requieren resultados positivos en las células somáticas de mamíferos in vivo que indiquen la existencia de a) efectos mutagénicos o b) otro tipo de interacción celular con incidencia en la mutagenicidad.
Especialmente, el último supuesto se verá confirmado por los resultados positivos de los estudios de mutagenicidad in vitro.

Para estudiar los efectos en las células somáticas in vivo se consideran apropiados los siguientes métodos:

3 a) Estudios de mutagenicidad en células somáticas in vivo:

- ensayos de micronúcleos en médula ósea o análisis de las metafases;
- análisis de los linfocitos periféricos en la metafase;
- ensayo de la mancha del pelo en ratón.

3 b) Estudios de interacción del ADN en las células somáticas in vivo:

- ensayos de intercambio de cromátidas hermanas en células somáticas;
- ensayos de síntesis de ADN no programada en células somáticas;
- estudios de unión (covalente) del mutágeno al ADN de la célula somática;
- estudios de lesiones del ADN en células somáticas (por ejemplo, por elución alcalina).

Por norma general, las sustancias que den resultados positivos solamente en uno o más estudios de mutagenicidad in vitro no se clasificarán. No obstante, se recomienda seguir investigando los efectos por medio de estudios in vitro, pero si no se dispone de datos correspondientes in vivo y muestra cierto parecido con carcinógenos o mutágenos conocidos se puede plantear su clasificación en la tercera categoría.

4.2.3. Sustancias tóxicas para la reproducción

4.2.3.1. En lo referente a la clasificación y etiquetado, y habida cuenta del estado actual de los conocimientos, estas sustancias se dividen en tres categorías:

Primera categoría

Sustancias de las que se sabe que perjudican la fertilidad de los seres humanos

Se dispone de pruebas suficientes para establecer una relación entre la exposición de los seres humanos a la sustancia y los problemas de fertilidad.

Sustancias de las que se sabe producen toxicidad para el desarrollo de seres humanos

Se dispone de pruebas suficientes para establecer una relación entre la exposición de los seres humanos a la sustancia y la aparición posterior de efectos tóxicos para el desarrollo de la descendencia.

Categoría 2

Sustancias que deben considerarse como perjudiciales para la fertilidad de los seres humanos

Se dispone de elementos suficientes para suponer firmemente que la exposición de los seres humanos a la sustancia puede producir problemas para la fertilidad a partir de:

- Pruebas claras de estudios con animales de problemas para la fertilidad en ausencia de efectos tóxicos o bien pruebas de problemas para la fertilidad que se presenta aproximadamente a los mismos niveles de dosis que otros efectos tóxicos pero no pueden considerarse como consecuencia inespecífica de los otros efectos tóxicos;

- Otros datos pertinentes.

Sustancias que deben considerarse como tóxicos para el desarrollo de los seres humanos

Se dispone de elementos suficientes para suponer firmemente que la exposición de seres humanos a la sustancia puede producir toxicidad para el desarrollo generalmente a partir de:

- Resultados claros en estudios con animales adecuados en que se hayan observado efectos en ausencia de signos de toxicidad marcada para la madre, o a los mismos niveles de dosis aproximadamente que otros efectos tóxicos, pero sin que se trate de una consecuencia secundaria inespecífica de los otros efectos tóxicos.

- Otros datos pertinentes.

Categoría 3

Sustancias preocupantes para la fertilidad humana:

Esta preocupación se basa generalmente en:

- Resultados en estudios con animales adecuados que proporcionan pruebas suficientes para suponer firmemente la presencia de problemas para la fertilidad en ausencia de efectos tóxicos, o bien pruebas de problemas para la fertilidad presentes a, aproximadamente, los mismos niveles de dosis que otros efectos tóxicos, pero sin que se trate de una consecuencia secundaria inespecífica de los otros efectos tóxicos, y sin que las pruebas sean suficientes para clasificar la sustancia en la categoría 2.

- Otros datos pertinentes.

Sustancias preocupantes para los seres humanos por sus posibles efectos tóxicos para el desarrollo

Esta preocupación se basa generalmente en:

- Resultados de estudios con animales adecuados que proporcionan pruebas suficientes para suponer firmemente la presencia de toxicidad para el desarrollo en ausencia de signos de toxicidad marcada para la madre, o bien a, aproximadamente, los mismos niveles de dosis que otros efectos tóxicos pero sin que trate de una consecuencia secundaria inespecífica de los otros efectos tóxicos, y sin que las pruebas sean suficientes para clasificar la sustancia en la categoría 2.

- Otros datos pertinentes.

4.2.3.2. Se asignarán los siguientes símbolos y frases de riesgos específicos:

Categoría 1:

Sustancias que perjudican la fertilidad de los seres humanos:

T; R60: Puede perjudicar la fertilidad

Sustancias que producen toxicidad para el desarrollo:

T; R61: Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto

Categoría 2:

Sustancias que deben considerarse como perjudiciales para la fertilidad de los seres humanos:

T; R60: Puede perjudicar la fertilidad

Sustancias que deben considerarse como tóxicos para el desarrollo de los seres humanos:

T; R61: Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto

Categoría 3:

Sustancias preocupantes para la fertilidad humana:

Xn; R62: Posible riesgo de perjudicar la fertilidad

Sustancias preocupantes para los seres humanos por sus posibles efectos tóxicos para el desarrollo:

Xn; R63: Posible riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto

4.2.3.3. Observaciones relativas a la clasificación de las sustancias tóxicas para la reproducción

La toxicidad para la reproducción incluye el deterioro de la función o capacidad reproductora masculina y femenina, así como la inducción de efectos nocivos no hereditarios en la descendencia. Así pues, estos efectos pueden clasificarse en dos grandes grupos:
1) Efectos sobre la fertilidad masculina o femenina,
2) Toxicidad en el desarrollo.

1) Efectos sobre la fertilidad masculina o femenina, donde se incluyen los efectos negativos sobre la libido, comportamiento sexual, cualquier aspecto de la espermatogénesis u ovogénesis, o sobre la actividad hormonal o la respuesta fisiológica que pueden interferir con la capacidad de fertilizar, el propio proceso de fertilización o el desarrollo del huevo fecundado hasta la fase de implantación, con inclusión de esta última.

2) Toxicidad del desarrollo, en su sentido más amplio para incluir cualquier efecto que interfiera con el desarrollo normal, tanto antes como después del nacimiento. Aquí se incluyen los efectos inducidos o manifestados en época prenatal así como los que se manifiestan tras el nacimiento. Se incluyen efectos embriotóxicos/fetotóxicos como disminución del peso corporal, retraso del crecimiento y del desarrollo, toxicidad para los órganos, muerte, aborto, defectos estructurales (efectos teratogénicos), defectos funcionales, defectos peri postnatales, y problemas de desarrollo físico o mental tras el nacimiento hasta la fase de desarrollo de la pubertad normal, con inclusión de ésta.

La clasificación de los productos químicos como tóxicos para la reproducción debe aplicarse a los productos químicos que tengan la propiedad intrínseca o específica de producir tales efectos tóxicos. Los productos químicos no deberán clasificarse como tóxicos para la reproducción cuando dichos efectos sean producidos exclusivamente como consecuencia secundaria inespecífica de otros efectos tóxicos. Los productos químicos más preocupantes en relación con los tóxicos para la reproducción son aquellos que a niveles de exposición no producen otros signos de toxicidad.

La inclusión de un compuesto en la Categoría 1 por sus efectos sobre la fertilidad y/o su toxicidad para el desarrollo se basa en datos epidemiológicos. La asignación a las Categorías 2 ó 3 se basa principalmente en datos obtenidos con animales. Los datos procedentes de estudios in vitro o con huevos de aves se consideran como "pruebas complementarias" y sólo excepcionalmente podrían llevar a una clasificación en ausencia de datos in vivo.

De forma similar a la mayoría de los demás tipos de efectos tóxicos, se supone que las sustancias tóxicas para la reproducción presentan un umbral por debajo del cual no se observan efectos negativos. Incluso aunque se hayan demostrado efectos claros en estudios con animales, la importancia para los seres humanos puede ser dudosa en función de las dosis administradas: por ejemplo, cuando se demuestran efectos sólo a dosis elevadas, o cuando existen marcadas diferencias tóxico-cinéticas, o cuando la vía de administración es inadecuada. Por estas o parecidas razones, puede justificarse la clasificación del producto en la Categoría 3 o incluso su no clasificación.

El Anexo V del Reglamento especifica un ensayo límite en el caso de sustancias de baja toxicidad. Si con una dosis de, al menos, 1000 mg/kg por vía oral no se observan efectos tóxicos para la reproducción, puede considerarse que no es necesario hacer estudios a otras dosis. Si se dispone de datos procedentes de estudios realizados con dosis superiores a la citada dosis límite, estos datos deberán evaluarse junto con otros datos pertinentes. En condiciones normales, se considera que los efectos observados sólo a dosis superiores a la dosis límite no implican necesariamente la clasificación del producto como tóxico para la reproducción.

EFECTOS SOBRE LA FERTILIDAD

Para la clasificación de una sustancia en la Categoría 2 por perjudicar a la fertilidad, deberá disponerse en principio de elementos claros en una especie animal, con datos complementarios sobre el mecanismo o el lugar de acción, o de la relación química con otros agentes conocidos antifertilizantes u otros datos procedentes de seres humanos que lleven a la conclusión de que tales efectos aparecerían probablemente en los seres humanos. Cuando sólo se disponga de estudios realizados en una especie sin más datos complementarios pertinentes, podrá ser adecuada la clasificación en la Categoría 3.

Puesto que el perjuicio de la fertilidad puede producirse como fenómeno secundario inespecífico por toxicidad generalizada grave o en presencia de inanición grave, la clasificación en la Categoría 2 sólo deberá hacerse si existen pruebas de algún grado de especificidad de la toxicidad para el sistema reproductor. Si se ha demostrado que el deterioro de la fertilidad en estudios con animales se debe a incapacidad para el acoplamiento, para clasificar el producto en la Categoría 2 será necesario en principio disponer de datos sobre el mecanismo de acción para interpretar si sería probable que se presentara en seres humanos algún efecto negativo, como una alteración del tipo de liberación hormonal.

TOXICIDAD EN EL DESARROLLO

Para la clasificación en la Categoría 2 deberá disponerse de pruebas claras que demuestren la presencia de efectos negativos durante el embarazo o tras el nacimiento pueden ser consecuencia secundaria

de la toxicidad materna, disminución de la ingesta de comida o de agua, tensiones de la madre, falta de cuidados maternos, deficiencias específicas de la dieta, deficientes condiciones de vida de los animales, infecciones intercurrentes, etc., es importante que los efectos observados aparezcan en estudios bien realizados y a dosis que no estén asociadas con toxicidad marcada para la madre. La vía de exposición también es importante. En particular, la inyección de producto irritante por vía intraperitoneal puede producir lesiones locales en el útero y su contenido; los resultados de estos estudios deberán interpretarse con precaución y, en principio, no serán suficientes por sí mismos para provocar la clasificación del producto.

La clasificación en la Categoría 3 se basa en criterios similares a los aplicables a la Categoría 2 pero puede utilizarse cuando el diseño experimental presenta deficiencias que hacen que las conclusiones sean menos convincentes, o cuando no pueda excluirse la posibilidad de que los efectos puedan deberse a fenómenos inespecíficos, como la toxicidad generalizada.

En general, la clasificación en la Categoría 3 o la ausencia de clasificación se permitirá en casos específicos cuando los únicos efectos registrados sean pequeños cambios en la incidencia de defectos espontáneos, pequeños cambios en las proporciones de variantes comunes como los que se observan en exámenes esqueléticos o pequeñas diferencias en las evaluaciones del desarrollo postnatal.

Efectos durante la lactancia

Las sustancias clasificadas como tóxicas para la reproducción y que también son preocupantes por sus efectos sobre la lactancia deberán etiquetarse además con **R64** (véanse los criterios en la sección 3.2.8.).

En relación con la clasificación, los efectos tóxicos sobre la descendencia que procedan exclusivamente de la exposición a través de la leche materna, o los efectos tóxicos derivados de la exposición directa de los niños no se considerarán "tóxicos para la reproducción", salvo que tales efectos produzcan un deterioro en el desarrollo de la descendencia.

Las sustancias no clasificadas como tóxicas para la reproducción pero que sean preocupantes por su toxicidad cuando pasan al niño durante el período de lactancia deberán etiquetarse con **R64** (véanse los criterios en la sección 3.2.8.). Esta frase R también puede ser adecuada para sustancias que afecten a la cantidad o calidad de la leche.

R64 se asignará en principio teniendo en cuenta:

a) estudios toxicocinéticos que indiquen la probabilidad de que la sustancia esté presente en niveles potencialmente tóxicos en la leche materna, y/o

b) resultados de estudios con una o dos generaciones de animales que indiquen la presencia de efectos negativos sobre la descendencia debido al paso del producto a la leche, y/o

c) datos obtenidos con seres humanos que indiquen un riesgo para los niños durante el período de lactancia.

Las sustancias que se acumulen en el organismo y que puedan pasar posteriormente a la leche durante la lactancia podrán etiquetarse con **R33 y R64**.

4.2.4 **Procedimiento para clasificar los preparados con respecto a los efectos específicos sobre la salud**

Si el preparado contiene una o más sustancias clasificadas con respecto a los criterios aquí establecidos, se clasificará conforme a los criterios a que se refieren los puntos 10 a 17 del apartado 5 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos (los límites de concentración figuran en el Anexo I del presente Reglamento, o en el Anexo I del Reglameto de preparados peligrosos, cuando las sustancias de que se trate no estén incluidas en el Anexo I o figuren sin indicar los límites de concentración).

5. CLASIFICACION SEGUN SUS EFECTOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE

5.1. Introducción

La clasificación de las sustancias peligrosas para el medio ambiente tiene como objetivo principal alertar al usuario sobre los riesgos que tales sustancias representan para los ecosistemas. Los criterios que se ofrecen a continuación se refieren principalmente a los ecosistemas acuáticos, aunque, hay que reconocer, determinadas sustancias pueden afectar, simultánea o alternativamente, a otros ecosistemas, cuyos componentes varían desde la microflora y microfauna del suelo hasta los primates.

Los criterios expuestos a continuación son una consecuencia directa de los métodos de ensayo establecidos en el Anexo V, siempre y cuando estén mencionados en éste. Los métodos de ensayo necesarios para los "datos básicos" a que se refiere el Anexo VII son limitados, y la información obtenida a partir de ellos puede resultar insuficiente para efectuar una clasificación adecuada. La clasificación puede requerir que se añadan otros datos derivados del Nivel 1 (Anexo VIII) o de otros estudios equivalentes. Además, las sustancias ya clasificadas pueden verse sometidas a una revisión en función de que se disponga de nuevos datos.

A efectos de clasificación y etiquetado, y habida cuenta del estado actual de los conocimientos, las sustancias se dividen en dos grupos, según sus efectos agudos y/o a largo plazo sobre los sistemas acuáticos o no acuáticos.

5.2 Criterios de clasificación, indicaciones de peligro, elección de las frases indicadoras de riesgo

5.2.1 **Medio ambiente acuático**

5.2.1.1 Las sustancias se clasificarán como peligrosas para el medio ambiente y se les asignarán el símbolo "N" y la correspondiente indicación de peligro, así como las frases de riesgo en función de los criterios siguientes:

R50: Muy tóxico para los organismos acuáticos

y

R53: Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

Toxicidad aguda:
- CL_{50} 96h (para peces) $\leq$ 1 mg/l
- o CE_{50} 48h (para Daphnia) $\leq$ 1 mg/l
- o CI_{50} 72h (para algas) $\leq$ 1 mg/l

y la sustancia no es fácilmente degradable
o log Pow (logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua) $\geq$ 3.0 (a menos que el FBC determinado experimentalmente sea $\leq$ 100).

R50: Muy Tóxico para los organismos acuáticos

Toxicidad aguda:
- CL_{50} 96h (para peces) $\leq$ 1 mg/l
- o CE_{50} 48h (para Daphnia) $\leq$ 1 mg/l
- o CI_{50} 72h (para algas) $\leq$ 1 mg/l

R51: Tóxico para los organismos acuáticos

y

R53: Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

Toxicidad aguda:
- CL_{50} 96h (para peces) $1mg/l < CL_{50} \leq 10mg/l$
- o CE_{50} 48h (para Daphnia) $1mg/l < CE_{50} \leq 10mg/l$
- o CI_{50} 72h (para algas) $1mg/l < CI_{50} \leq 10mg/l$

y la sustancia no es fácilmente degradable
o el log Pow es $\geq$3.0 (a menos que el FBC determinado experimentalmente sea $\leq$100).

5.2.1.2 Las sustancias se clasificarán como peligrosas para el medio ambiente de acuerdo con los criterios establecidos a continuación. También se les asignarán las frases de riesgo en función de los criterios siguientes:

R52: Nocivo para los organismos acuáticos

y

R53: Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

Toxicidad aguda:
- CL_{50} 96h (para peces) $10mg/l < CL_{50} \leq 100mg/l$
- o CE_{50} 48h (para Daphnia) $10mg/l < CE_{50} \leq 100mg/l$
- o CI_{50} 72h (para algas) $10mg/l < CI_{50} \leq 100mg/l$

y la sustancia no es fácilmente degradable.

Este criterio se aplicará si no hay pruebas científicas adicionales de degradación y/o toxicidad suficientes para garantizar adecuadamente que ni la

sustancia ni el producto de su degradación constituirán un peligro retardado o a largo plazo para el medio ambiente acuático. Estas pruebas científicas adicionales se basarán por regla general en los estudios que se requieren en el Nivel 1 (Anexo VIII) o equivalentes, e incluirán:

(i) potencial demostrado de rápida degradación en el medio acuático;

(ii) ausencia de efectos de toxicidad crónica en una concentración de 1,0 mg l^{-1}, por ejemplo, una concentración sin efectos observables superior a 1,0 mg l^{-1}, determinada en un estudio prolongado de toxicidad con peces o Daphnia.

R52: Nocivo para los organismos acuáticos

Sustancias que no cumplan los criterios indicados en este capítulo pero que, sin embargo, pueden presentar un peligro para la estructura o el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, según las pruebas de que se disponga sobre su toxicidad.

R53: Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

Sustancias que no cumplan los criterios indicados en este capítulo pero que puedan presentar un peligro, retardado o a largo plazo, para la estructura o funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, según las pruebas de que se disponga sobre su persistencia, potencial de acumulación y sobre su destino y comportamiento, previstos u observados, en el medio ambiente.

Por ejemplo, las sustancias poco solubles en agua, es decir, con una solubilidad inferior a 1mg^{-1}, se incluirán en este criterio siempre que:

a) no sean fácilmente degradables y
b) el log Pow sea $\geq$3,0 (a menos que el FBC determinado experimentalmente sea $\leq$100).

Este criterio se aplicará si no hay pruebas científicas adicionales de degradación o toxicidad suficientes para garantizar adecuadamente que ni la sustancia ni el producto de su degradación constituirán un peligro retardado o a largo plazo para el medio ambiente acuático.

Estas pruebas científicas adicionales se basarán por regla general en los estudios que se requieren en el Nivel 1 (Anexo VIII) o equivalente, e incluirán:

(i) potencial demostrado de rápida degradación en el medio acuático;

(ii) ausencia de efectos de toxicidad crónica en el límite de solubilidad, por ejemplo, una concentración sin efectos observables superior al límite de solubilidad determinado en un estudio prolongado de toxicidad con peces o Daphnia.

5.2.1.3. Observaciones sobre la determinación de la CI_{50} para algas y la degradabilidad

- En caso de que se pueda demostrar que con las sustancias de intensa coloración el crecimiento de algas solamente resulta inhibido a consecuencia de la reducción de la intensidad luminosa, no se deberá utilizar CI_{50} 72h (para algas) como base de la clasificación.

- Se considerará que las sustancias son fácilmente degradables si se cumplen los siguientes criterios:

a) si se alcanzan los siguientes niveles de degradación en los estudios de biodegradación de 28 días:
   - en ensayos basados en carbono orgánico disuelto: 70%
   - en ensayos basados en reducción de oxígeno o en producción de dióxido de carbono: 60% de los niveles máximos teóricos.

   Estos niveles de biodegradación deben alcanzarse en un plazo de 10 días a partir del comienzo de la degradación, que se determina en el momento en que se ha degradado el 10% de la sustancia

o

b) si, en aquellos casos en que sólo se dispone de datos sobre la DQO y DBO_5, el cociente DBO_5/DQO es igual o superior a 0,5

o

c) si se dispone de otras pruebas científicas convincentes que demuestren que la sustancia se puede degradar (biótica y/o abiótica) en el medio acuático hasta un nivel de > 70% en un período de 28 días.

5.2.2 **Medio ambiente no acuático**

5.2.2.1. Las sustancias se clasificarán como peligrosas para el medio ambiente y se les asignarán el símbolo "N" y la correspondiente indicación de peligro, así como las frases de riesgo en función de los criterios siguientes:

R54 Tóxico para la flora
R55 Tóxico para la fauna
R56 Tóxico para los organismos del suelo
R57 Tóxico para las abejas
R58 Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente

Sustancias que, según las pruebas sobre su toxicidad, persistencia, potencial de acumulación y su destino y comportamiento en el medio ambiente, previstos u observados, puedan suponer un peligro, inmediato, retardado o a largo plazo para la estructura o funcionamiento de otros ecosistemas naturales aparte de los expuestos en 5.2.1. Se elaborarán posteriormente criterios detallados.

R59: Peligroso para la capa de ozono

Sustancias que, según las pruebas sobre sus propiedades y su destino y comportamiento en el medio ambiente (previstos u observados), pueden suponer un peligro para la estructura y/o funcionamiento de la capa de ozono estratosférico. Aquí se incluyen las sustancias citadas en los Grupos I, II, III, IV y V del Anexo I del Reglamento (CEE) nº 594/91 del Consejo, relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono (D.O. L 67 de 14 de marzo de 1991, p. 1).

5.2.2.2. Las sustancias se clasificarán como peligrosas para el medio ambiente de conformidad con los criterios establecidos a continuación. Las frases de riesgo se asignarán también de conformidad con los siguientes criterios:

R59: Peligrosos para la capa de ozono

Sustancias que no estando sujetas a los criterios establecidos en el punto 5.2.2.1., pueden representar, en base a las evidencias disponibles de sus propiedades y a su destino medioambiental o el comportamiento previsible u observado, un peligro para la estructura y/o el funcionamiento de la capa estratosférica de ozono. Esto incluye las sustancias que están incluidas en el anexo I el grupo VI del reglamento (CEE) Nº 594/91 del Consejo relativa a las sustancias que reducen la capa de ozono (O.J. L67 del 14 de marzo de 1991, p. 1).

6. **ELECCION DE LAS FRASES DE CONSEJOS DE PRUDENCIA**

6.1. **Introducción**

Las frases de prudencia (frases S) se asignarán a las sustancias y preparados peligrosos de acuerdo con los criterios generales siguientes. Además, en el Anexo II del Reglamento de preparados peligrosos incluye una lista de precauciones obligatorias para ciertos preparados.

Siempre que el fabricante es mencionado en el Capítulo 6, se refiere a la persona responsable de comercializar la sustancia o preparado.

6.2. **Frases de prudencia relativas a las sustancias y preparados**

S1 Consérvese bajo llave

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y corrosivos.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados antes citados que se vendan a los consumidores en general.

S2 Manténgase fuera del alcance de los niños

- Aplicación
  - Todas las sustancias y preparados peligrosos.

- Criterios de utilización

  - Obligatoria para todas las sustancias y preparados peligrosos que se vendan a los consumidores en general, a excepción de aquéllos solamente clasificados como peligrosos para el medio ambiente.

S3 Consérvese en lugar fresco

- Aplicación

  - Peróxidos orgánicos.

  - Otras sustancias y preparados peligrosos cuyo punto de ebullición sea inferior o igual a 40°C.

- Criterios de utilización

  - Obligatoria para los peróxidos orgánicos, salvo si se utiliza la frase S47.

  - Recomendada para las otras sustancias o preparados peligrosos cuyo punto de ebullición sea inferior o igual a 40°C.

S4 Manténgase lejos de locales habitados

- Aplicación

  - Sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos.

- Criterios de utilización

  - Limitada normalmente a las sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos, cuando sea conveniente reforzar la frase S13; por ejemplo, cuando haya riesgo de inhalación y dichas sustancias o preparados deban almacenarse lejos de locales habitados. La advertencia no tiene la finalidad de impedir una utilización apropiada de tales sustancias o preparados en locales habitados.

S5 Consérvese en ... (líquido apropiado a especificar por el fabricante)

- Aplicación

  - Sustancias y preparados sólidos inflamables de forma espontánea.

- Criterios de utilización

  - Limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, el sodio, el potasio o el fósforo blanco.

S6 Consérvese en ... (gas inerte a especificar por el fabricante)

- Aplicación

  - Sustancias y preparados peligrosos que deban conservarse en atmósfera inerte.

- Criterios de utilización

  - Limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, determinados compuestos organometálicos.

S7 Manténgase el recipiente bien cerrado

- Aplicación

  - Peróxidos orgánicos

  - Sustancias y preparados que puedan desprender gases muy tóxicos, tóxicos, nocivos o extremadamente inflamables.

  - Sustancias y preparados que en contacto con la humedad desprendan gases extremadamente inflamables.

  - Sólidos fácilmente inflamables.

- Criterios de utilización

  - Obligatoria para los peróxidos orgánicos.

  - Recomendada para los demás casos arriba citados.

S8 Manténgase el recipiente en lugar seco

- Aplicación

  - Sustancias y preparados que puedan reaccionar violentamente con el agua.

  - Sustancias y preparados que, en contacto con el agua, liberan gases extremadamente inflamables.

  - Sustancias y preparados que, en contacto con el agua, liberan gases muy tóxicos o tóxicos.

- Criterios de utilización

  - Limitada normalmente a los casos arriba citados, cuando sea necesario reforzar las advertencias de las frases R14, R15 en particular, y R29.

S9 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado

- Aplicación

  - Sustancias y preparados volátiles que puedan desprender vapores muy tóxicos, tóxicos o nocivos.

  - Líquidos extremadamente inflamables o fácilmente inflamables y gases extremadamente inflamables.

- Criterios de utilización

  - Recomendada para las sustancias y preparados volátiles que pueden desprender vapores muy tóxicos, tóxicos o nocivos.

  - Recomendada para líquidos extremadamente inflamables o fácilmente inflamables o gases extremadamente inflamables.

S12 No cerrar el recipiente herméticamente

- Aplicación

  - Sustancias y preparados que puedan hacer estallar su recipiente por desprendimiento de gases o de vapores.

- Criterios de utilización

  - Limitada normalmente a los casos especiales arriba citados.

S13 Manténgase lejos de alimentos, bebidas y piensos

- Aplicación

  - Sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y nocivos.

- Criterios de utilización

  - Recomendada cuando dichas sustancias o preparados puedan ser utilizados por el público en general.

S14 Consérvese lejos de ... (materiales incompatibles a especificar por el fabricante)

- Aplicación

  - Peróxidos orgánicos

- Criterios de utilización

  - Obligatoria para los peróxidos orgánicos y limitada, normalmente, a los mismos. No obstante puede ser útil en ciertos casos excepcionales, cuando la incompatibilidad pudiera provocar un riesgo específico.

S15 Consérvese alejado del calor

- Aplicación

  - Sustancias y preparados que puedan descomponerse o reaccionar espontáneamente bajo el efecto del calor.

- Criterios de utilización

  - Limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, los monómeros; no obstante, dicha frase no será obligatoria si ya se les han asignado las frases R2, R3 y/o R5.

S16 Consérvese alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar

- Aplicación
  - Líquidos extremadamente inflamables o fácilmente inflamables y gases extremadamente inflamables.
- Criterios de utilización
  - Recomendada para las sustancias y preparados arriba mencionados, salvo si ya se les han asignado las frases R2, R3 y/o R5.

S17 Manténgase lejos de materias combustibles

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que puedan formar mezclas explosivas o espontáneamente inflamables con materias combustibles.
- Criterios de utilización
  - Utilizar en casos especiales (por ejemplo, para reforzar la R8 y R9).

S18 Manipúlese y ábrase el recipiente con prudencia

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que puedan producir una sobrepresión en el recipiente.
  - Sustancias y preparados que puedan ocasionar la formación de peróxidos explosivos.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a los casos arriba citados cuando haya un riesgo de lesiones oculares y/o cuando dichas sustancias y preparados puedan ser utilizados por el público en general.

S20 No comer ni beber durante su utilización

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos y corrosivos.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales (por ejemplo, arsénico y compuestos de arsénico, fluoroacetatos) en particular cuando dichos productos puedan ser utilizados por el público en general.

S21 No fumar durante su utilización

- Aplicación
  - Sustancias y preparados cuya combustión produzca compuestos tóxicos.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, compuestos halogenados.

S22 No respirar el polvo

- Aplicación
  - Todas las sustancias y preparados sólidos peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados antes citados a los que se asigne R42.
  - Recomendada para las sustancias y preparados antes mencionados que se suministran en forma de polvo inhalable y de los que no se conocen los riesgos para la salud que pueda provocar su inhalación.

S23 No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles (denominaciones adecuadas a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Todas las sustancias y preparados peligrosos, líquidos o gaseosos peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados antes citados a los que se asigne R42.
  - Obligatoria para las sustancias y preparados destinados a utilizarse en forma de aerosoles. Se les deberá asignar además la frase S38 o la S51.
  - Recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por inhalación no mencionados en las frases de riesgo asignadas a dichas sustancias. No obstante, esta frase podrá utilizarse para reforzar tales frases de riesgo.

S24 Evítese el contacto con la piel

- Aplicación
  - Todas las sustancias y preparados peligrosos para la salud.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados a los que se haya asignado R43, salvo que también se les haya asignado S36.
  - Recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por contacto con la piel no mencionados en las frases de riesgo asignadas a dichas sustancias. No obstante, esta frase podrá utilizarse para reforzar tales frases de riesgo.

S25 Evítese el contacto con los ojos

- Aplicación
  - Sustancias y preparados corrosivos o irritantes.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos excepcionales, por ejemplo, cuando se considere esencial resaltar el riesgo para los ojos ya indicado mediante las frases R34, R35, R36 o R41. Por consiguiente, dicho consejo es importante si estas sustancias y preparados pueden ser utilizados por los consumidores en general los cuales, normalmente, no tienen a su disposición un medio de protección adecuado para los ojos o para la cara.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico

- Aplicación
  - Sustancias y preparados corrosivos o irritantes.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados corrosivos, así como para las sustancias y preparados que deban llevar la frase R41.
  - Recomendada para las sustancias y preparados irritantes que deban llevar la frase R36.

S27 Quítese inmediatamente la ropa contaminada

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos o corrosivos.
- Criterios de utilización
  - Recomendada para las sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos, fácilmente absorbibles por la piel, y para las sustancias y preparados corrosivos. Sin embargo, esta frase de prudencia no se deberá utilizar cuando se haya asignado S36.

S28 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con ... (productos a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos o corrosivos.
- Criterios de utilización

- Obligatoria para sustancias y preparados muy tóxicos.
- Recomendada para las otras sustancias y preparados antes citados, especialmente cuando el agua no es el líquido más apropiado para el lavado.

S29 No tirar los residuos por el desagüe

- Aplicación
  - Líquidos extremada o fácilmente inflamables que no se mezclan con el agua.
- Criterios de utilización
  - Recomendada para las sustancias y preparados antes citados que vaya a utilizar probablemente el público en general.

S30 No echar jamás agua a este producto

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que reaccionen violentamente con el agua.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, ácido sulfúrico. También podrá utilizarse para aclarar una información, para reforzar R14 o, incluso, como alternativa a R14.

S33 Evítese la acumulación de cargas electro estáticas

- Aplicación
  - Sustancias y preparados extremada o fácilmente inflamables.
- Criterios de utilización
  - Recomendada para las sustancias y preparados utilizados que no absorben la humedad en la industria. No se utiliza prácticamente nunca para las sustancias y preparados comercializados para su uso por el público.

S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles

- Aplicación
  - Sustancias y preparados explosivos.
  - Sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos.
  - Sustancias peligrosas para el medio ambiente.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados explosivos que no sean peróxidos orgánicos.
  - Recomendado para las sustancias y los preparados muy tóxicos y tóxicos, particularmente cuando vayan a ser utilizados con probabilidad por el público en general.
  - Recomendada para las sustancias peligrosas para el medio ambiente a las que no se aplique S56 cuando tales sustancias puedan ser utilizadas por el público en general.

S36 Usen indumentaria protectora adecuada

- Aplicación
  - Peróxidos orgánicos.
  - Sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos o nocivos.
  - Sustancias y preparados corrosivos.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para sustancias y preparados muy tóxicos y corrosivos.
  - Obligatoria para sustancias y preparados a los que se haya asignado R21 o R24.
  - Obligatoria para las sustancias carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción de la categoría 3, salvo cuando sus efectos se produzcan sólo por inhalación de la sustancia o preparado.
  - Obligatotia para los peróxidos orgánicos
  - Recomendada para sustancias y preparados muy tóxicos si no se conoce el valor DL_{50} por vía dérmica y es probable que la sustancia o preparado sea tóxico por contacto con la piel.
  - Recomendada para las sustancias y preparados utilizados en la industria cuando puedan causar daño a la salud por una exposición prolongada.

S37 Usen guantes adecuados

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos, nocivos o corrosivos.
  - Peróxidos orgánicos.
  - Sustancias y preparados irritantes para la piel.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para sustancias y preparados muy tóxicos y corrosivos,.
  - Obligatoria para sustancias y preparados a los que se les haya asignado R21, R24 o R43.
  - Obligatoria para las sustancias carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción de la categoría 3, salvo cuando sus efectos se produzcan sólo por inhalación de la sustancia o preparado.
  - Obligatoria para los peróxidos orgánicos.
  - Recomendada para sustancias y preparados tóxicos si no se conoce el valor DL_{50} por vía dérmica y es probable que la sustancia o preparado sea tóxico por contacto con la piel.
  - Recomendada para las sustancias y preparados irritantes para la piel por sus propiedades desengrasantes.

S38 En caso de ventilación insuficiente, usen un equipo respiratorio adecuado

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos o tóxicos.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a aquellos casos especiales en que las sustancias y preparados muy tóxicos o tóxicos se utilizan en la industria o en la agricultura.

S39 Usen protección para los ojos/la cara

- Aplicación
  - Peróxidos orgánicos.
  - Sustancias y preparados corrosivos, incluidos los irritantes, que puedan provocar graves lesiones oculares.
  - Sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados a los que se haya asignado R34, R35 o R41.
  - Obligatoria para los peróxidos orgánicos.
  - Recomendada cuando sea necesario llamar la atención del usuario sobre los riesgos por contacto con los ojos no mencionados en las frases de riesgo que deben asignarse.
  - Limitada normalmente a casos excepcionales en que al utilizar las sustancias y preparados muy tóxicos y tóxicos haya riesgo de salpicaduras y que dichas sustancias y preparados puedan ser fácilmente absorbidos por la piel.

S40 Para limpiar el suelo y los objetos contaminados por este producto, úsese ... (a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Todas las sustancias y preparados peligrosos.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a las sustancias y preparados peligrosos para los que el agua no es el medio de limpieza más adecuado (por ejemplo, cuando se debe recurrir a absorberlos con un material pulverulento o a disolverlo con un disolvente, etc.) y en caso de que sea imperioso, por razones de salud o de seguridad, hacer constar esta advertencia en el etiquetado.

S41 En caso de incendio y/o de explosión no respirar los humos

- Aplicación
  - Sustancias y preparados peligrosos en cuya combustión se desprenden gases muy tóxicos o tóxicos.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales.

S42 Durante las fumigaciones/pulverizaciones use un equipo respiratorio adecuado (denominaciones adecuadas a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Sustancias y preparados destinados a dicho uso, pero que puedan poner en peligro la salud y la seguridad del usuario si no se toman las medidas de precaución adecuadas.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales.

S43 En caso de incendio, utilizar ... (los medios de extinción los debe especificar el fabricante) (si el agua aumenta el riesgo, se deberá añadir: "No usar nunca agua").

- Aplicación
  - Sustancias y preparados extremadamente inflamables, fácilmente inflamables e inflamables.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, liberan gases extremadamente inflamables.
  - Recomendada para las sustancias y preparados extremadamente inflamables, fácilmente inflamables e inflamables, especialmente cuando no sean miscibles con el agua.

S45 En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta)

- Aplicación
  - Sustancias y preparados muy tóxicos.
  - sustancias y preparados tóxicos y corrosivos.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados mencionados anteriormente.

S46 En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase

- Aplicación
  - Todas las sustancias y preparados peligrosos que no sean los muy tóxicos, tóxicos, corrosivos o peligrosos para el medio ambiente.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para todas las sustancias y preparados peligrosos antes citados que puedan ser utilizados por el público en general, salvo si la ingestión de dichos productos puede considerarse inofensiva, especialmente para los niños.

S47 Consérvese a una temperatura no superior a ... °C (a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que, a cierta temperatura, son inestables.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales (por ejemplo, determinados peróxidos orgánicos).

S48 Consérvese húmedo con ... (medio apropiado a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que si se desecan pueden ser muy sensibles a las chispas, al frotamiento o al choque.
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a casos especiales, por ejemplo, las nitrocelulosas.

S49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen

- Aplicación
  - Sustancias y preparados sensibles a la descomposición catalítica.
- Criterios de utilización
  - Sustancias y preparados sensibles a la descomposición catalítica, por ejemplo, algunos peróxidos orgánicos.

S50 No mezclar con ... (a especificar por el fabricante)

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que puedan reaccionar con el producto especificado y liberar gases muy tóxicos o tóxicos.
  - Peróxidos orgánicos.
- Criterios de utilización
  - Recomendada para las sustancias y preparados antes citados que puedan ser vendidos al público en general, cuando esta frase sea preferible a R31 o R32.
  - Obligatoria para determinados peróxidos que con catalizadores o iniciadores puedan producir reacciones violentas.

S51 Usese únicamente en lugares bien ventilados

- Aplicación
  - Sustancias y preparados que originen o puedan originar desprendimiento de vapores, polvo, aerosoles, humos, nieblas, etc., que aumenten los riesgos por inhalación o los riesgos de incendio o de explosión.
- Criterios de utilización
  - Recomendada cuando no convenga utilizar la frase S38. Por consiguiente, el uso de esta frase es importante cuando tales sustancias y preparados puedan ser utilizados por el público en general.

S52 No usar sobre grandes superficies en locales habitados

- Aplicación
  - Sustancias volátiles muy tóxicas, tóxicas y nocivas y preparados que las contengan.
- Criterios de utilización
  - Recomendada cuando la exposición prolongada a dichas sustancias puede afectar a la salud a causa de la volatización que se produce en grandes superficies, en viviendas o locales habitados.

S53 Evítese la exposición - Recábense instrucciones especiales antes del uso

- Aplicación
  - Sustancias y preparados carcinogénicos, mutagénicos y/o tóxicos para la reproducción.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y los preparados antes mencionados a los que se han asignado las frases R45, R46, R49, R60 o R61.

S56 Elimínense esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos

- Aplicación
  - Sustancias peligrosas para el medio ambiente.
- Criterios de utilización
  - Recomendada para sustancias a las que se haya asignado el símbolo "N" y vayan a ser utilizadas probablemente por el público en general.

S57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente

- Aplicación
  - Sustancias a las que se haya asignado el símbolo "N".
- Criterios de utilización
  - Limitada normalmente a sustancias que no vayan a ser utilizadas con probabilidad por el público en general.

S59 Remítirse al fabricante o proveedor para obtener información sobre su recuperación/reciclado

- Aplicación
  - Sustancias peligrosas para el medio ambiente.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias peligrosas para la capa de ozono.
  - Recomendada para las otras sustancias que hayan recibido el símbolo "N" y cuya recuperación o reciclado se recomienda.

S60 Elimínese el producto y su recipiente como residuos peligrosos

- Aplicación
  - Sustancias peligrosas para el medio ambiente.
- Criterios de utilización
  - Recomendado para sustancias a las que se hayan asignado el símbolo "N" y no vayan a ser utilizadas probablemente por el público en general.

S61 Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad

- Aplicación
  - Sustancias peligrosas para el medio ambiente.
- Criterios de utilización
  - Utilizada normalmente con sustancias a las que se haya asignado el símbolo "N".
  - Recomendada para todas las sustancias clasificadas como peligrosas para el medio ambiente que no estén incluidas en la descripción anterior.

S62 En caso de ingestión no provocar el vómito: acuda inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase

- Aplicación
  - Sustancias y preparados líquidos con una viscosidad cinemática, medida con un viscosímetro rotatorio según la norma ISO 3219 o un método equivalente, que sea inferior a 7×10^{-6} m^2/sec a 40°C y que contengan hidrocarburos alifáticos o aromáticos en una concentración total igual o superior al 10%.
  - No aplicable a las sustancias y preparados comercializados en envases para aerosoles.
- Criterios de utilización
  - Obligatoria para las sustancias y preparados antes citados si se venden al público en general o es probable su uso por éste.
  - Recomendada para las sustancias y preparados antes citados cuando se empleen en la industria.

7. ETIQUETADO

7.1. Una vez clasificada la sustancia o preparado, la etiqueta correspondiente se determinará con arreglo a lo establecido en el Artículo 19 del presente Reglamento y el artículo 7 del Reglamento de preparados peligrosos. La presente sección explica cómo se determina la etiqueta y, sobre todo, sirve de guía para elegir las frases de precaución y de riesgo adecuadas.

La etiqueta contendrá la siguiente información:

a) el nombre o nombres de las sustancias que deban figurar en la etiqueta;
b) el nombre, dirección y número de teléfono del fabricante o importador;
c) los símbolos e indicación de peligro;
d) las frases que indiquen los riesgos específicos (frases R);
e) las frases que indiquen los consejos de prudencia (frases S);
f) el número CEE cuando se trate de sustancias.

7.1.1. Cuando se trate de sustancias incluidas en el Anexo I del presente Reglamento, la etiqueta incluirá las palabras "etiqueta CEE".

7.1.2. **Elección final de las frases de riesgo y de prudencia**

A pesar de que la elección final de las frases R y S se rija, en primer lugar, por la necesidad de proporcionar toda la información indispensable, conviene asimismo tener presente la claridad y el impacto de la etiqueta. Para mayor claridad, la información necesaria deberá expresarse en un número mínimo de frases.

Respecto a las sustancias y preparados irritantes, fácilmente inflamables o comburentes, no será necesario indicar las frases R y las frases S cuando el contenido del envase no exceda de los 125 ml. Esta norma se aplicará también a las sustancias nocivas de igual contenido, cuando no se vendan al público en general.

7.1.3. Las indicaciones tales como "no tóxico", "no nocivo" o cualquier otra indicación análoga no podrán inscribirse en la etiqueta ni en el envase de las sustancias o preparados incluidos en el ámbito del presente Reglamento y del Reglamento de preparados peligrosos.

7.1.4. El Anexo II del Reglamento de preparados peligrosos contiene disposiciones específicas con respecto al etiquetado de ciertos preparados.

7.2. **Nombre(s) químico(s) que deben figurar en la etiqueta**

7.2.1. Cuando las sustancias estén incluidas en el Anexo I del presente Reglamento, la etiqueta llevará el nombre de las sustancias designadas con alguno de los términos que figuran en el mismo.

Cuando las sustancias no estén incluidas en el Anexo I, el nombre se establecerá con arreglo a una nomenclatura química reconocida internacionalmente, según se indica en la sección 1.4.

7.2.2. Cuando se trate de preparados, la elección de los nombres que deban figurar en la etiqueta se ajustará a lo dispuesto en el apartado 1.3ª del artículo 7 del Reglamento de preparados peligrosos.

Nota:

Si se trata de preparados concentrados cuyo uso se destina a la industria del perfume:

- la persona responsable de su comercialización podrá identificar simplemente la sustancia sensibilizadora

que, a su juicio, sea la principal causante del riesgo de sensibilización;

- si se trata de sustancias naturales, el nombre químico podrá ser del tipo de "aceite esencial de ...", "extracto de ...", en lugar del nombre de los componentes de dicho aceite o extracto.

7.3. Elección de los símbolos de peligro

El diseño de los símbolos de peligro y la redacción de las indicaciones de peligro deberán coincidir con los establecidos en el Anexo II. Los símbolos deberán ir impresos en negro sobre fondo amarillo anaranjado.

7.3.1. Cuando se trate de sustancias incluidas en el Anexo I, los símbolos e indicaciones de peligro serán los que figuran en este Anexo.

7.3.2. Cuando se trate de sustancias peligrosas no incluidas aún en el Anexo I y cuando se trate de preparados, los símbolos e indicaciones de peligro se ajustarán a lo dispuesto en el presente Anexo.

Cuando una sustancia deba llevar más de un símbolo:

- la obligación de poner el símbolo T convierte en facultativos los símbolos X y C;

- la obligación de poner el símbolo C convierte en facultativo el símbolo X;

- la obligación de poner el símbolo E convierte en facultativos los símbolos F y O.

7.4. Elección de las frases de riesgo

La redacción de las frases R se ajustará a lo establecido en el Anexo III del presente Reglamento.

Las frases R combinadas del Anexo III se aplicarán cuando corresponda.

7.4.1. Cuando se trate de sustancias incluidas en el Anexo I, las frases R serán las indicadas en el mismo.

7.4.2. Cuando se trate de sustancias no incluidas en el Anexo I, las frases R se seleccionarán con arreglo a los siguientes criterios y prioridades:

a) peligros que originen efectos sobre la salud;

(i) las frases R que correspondan a la categoría del peligro caracterizada por un símbolo deberán figurar en la etiqueta;

(ii) las frases R que correspondan a otras categorías de peligro que no están caracterizada por un símbolo, conforme al artículo 19 del presente Reglamento.

b) peligros derivados de las propiedades fisicoquímicas:

- se aplicarán los criterios descritos en la letra a) del punto 7.4.2, excepto cuando no sea necesario indicar las frases de riesgo "extremadamente inflamable" cuando supongan una repetición de la indicación de peligro ilustrada con un símbolo.

c) peligrosos para el medio ambiente:

- las frases R correspondientes a la clasificación "peligrosa para el medio ambiente" deberán figurar en la etiqueta.

7.4.3 En el caso de los preparados, las frases R se seleccionarán en función de los siguientes criterios y prioridades:

a) peligros que originan efectos sobre la salud:

(i) las frases R que correspondan a la categoría de peligro ilustrada por un símbolo. En determinados casos, las frases R deberán adaptarse según los cuadros del Anexo I del Reglamento de preparados peligrosos. Más en concreto, deberán figurar en la etiqueta las frases R del o los componentes que dan lugar a que se asigne al preparado la categoría de peligroso.

(ii) las frases R que correspondan a otras categorías de peligro que se hayan asignado a los componentes, pero que no estén ilustradas por un símbolo, conforme al apartado 1.4° del Artículo 7 del Reglamento de preparados peligrosos.

b) peligros derivados de las propiedades fisicoquímicas:

- se aplicarán los criterios descritos en la letra a) del punto 7.4.3., no será necesario indicar las frases de riesgo "extremadamente inflamable" o "facilmente inflamables" cuando supongan una repetición de la indicación de peligro ilustrada con un símbolo.

Como norma general, en el caso de los preparados, bastará un máximo de cuatro frases R para describir el riesgo; a tal efecto, las frases combinadas enumeradas en el Anexo III se considerarán como frases simples. No obstante, las frases tipo deberán abarcar todos los riesgos principalmente asociados al preparado.

Sin embargo, si el fabricante opina que es necesario precisar la existencia de riesgos para el medio ambiente se añadirán otras frases R adecuadas.

7.5. Frases de prudencia

La redacción de las frases S se ajustará a lo establecido en el Anexo IV del presente Reglamento.

Las frases S combinadas del Anexo IV se aplicarán cuando corresponda.

7.5.1. Cuando se trate de sustancias incluidas en el Anexo I, las frases S serán las indicadas en este Anexo. Cuando no se indique ninguna frase S, el fabricante o importador podrá incluir cualquier frase o frases S apropiadas.

7.5.2. Elección de las frases de prudencia

La elección final de las frases S deberán hacerse teniendo en cuenta las frases R indicadas en la etiqueta y el uso previsto para la sustancia o el preparado:

- por regla general, bastará con un máximo de cuatro frases S para formular de modo adecuado la medida de precaución; a tal efecto, las frases combinadas enumeradas en el Anexo IV se considerarán como frases simples;

- en el caso de peligroso para el medio ambiente se utilizará un mínimo de una frase S y un máximo de cuatro;

- si se seleccionan cuidadosamente las frases S, algunas frases R resultan superfluas y viceversa: algunas frases de precaución que corresponden claramente a frases de riesgo sólo figurarán en la etiqueta cuando se quiera resaltar una advertencia concreta.

- en la elección de frases S, se prestará una atención muy especial a las condiciones de uso previstas para determinadas sustancias y preparados, por ejemplo, la pulverización o cualquier otra aplicación de los aerosoles. Se elegirán las frases teniendo en cuenta la utilización prevista;

- las frases de prudencia S1, S2 y S45 son <u>obligatorias</u> para todas las sustancias y preparados muy tóxicos, tóxicos y corrosivos que se venden al público en general.

- Las frases de prudencia S2 y S46 son obligatorias para todas las demás sustancias (excepto aquéllas solamente clasificadas como peligrosas para el medio ambiente) y preparados peligrosos que se vendan al público en general.

7.6. Número CEE

Si una sustancia citada en la etiqueta figura en el Inventario Europeo de sustancias Químicas Comerciales Existentes (EINECS) o en la Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas (ELINCS), se indicará también en la etiqueta el número EINECS o ELINCS de la sustancia. Este requisito no se aplica a los preparados.

8. <u>CASOS ESPECIALES: SUSTANCIAS</u>

8.1. Bombonas portátiles de gas

Para las bombonas portátiles de gas, los requisitos del etiquetado se considerarán satisfechos cuando se cumpla lo dispuesto en el Artículo 19 o en la letra b) del apartado 5 del Artículo 20 de este Reglamento.

Sin embargo, como excepción a lo dispuesto en los apartados 1 y 2 del Artículo 20, puede utilizarse una de las siguientes alternativas para cilindros de gas con una capacidad de agua inferior o igual a 150 litros:

- el formato y las dimensiones de la etiqueta pueden seguir las prescripciones de la norma ISO: ISO/DP 7225.

- la información especificada en el apartado 1 del Artículo 19 puede aparecer sobre un disco o una etiqueta duradera de información que se mantendrá unida al cilindro.

8.2. **Metales en forma maciza**

Estas sustancias están clasificadas en el Anexo I de este Reglamento o bien se clasificarán con arreglo al Artículo 5.5 de la misma. No obstante, algunas de ellas, aunque están clasificadas conforme al Artículo 2 de dicho Reglamento, bajo la forma en que se comercializan no suponen peligro para la salud humana en caso de inhalación, ingestión o contacto con la piel. Este tipo de sustancias no requiere una etiqueta conforme al Artículo 19 de este Reglamento. Sin embargo, el responsable de su comercialización comunicará al usuario toda la información que debería figurar en la etiqueta, en el formato establecido en el Artículo 22 del mismo.

9. **CASOS ESPECIALES: PREPARADOS**

9.1. **Preparados gaseosos (mezclas de gases)**

En lo referente a los preparados gaseosos, será preciso tener en cuenta:

- la evaluación de las propiedades fisicoquímicas,
- la evaluación de los peligros para la salud.

9.1.1. **Evaluación de la propiedades fisicoquímicas**

9.1.1.1. Inflamabilidad

Las propiedades inflamables de estos preparados se determinarán de acuerdo con el apartado 2 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos, según los métodos especificados en la Parte A del Anexo V del presente Reglamento.

Los preparados se clasificarán de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos y con respecto a los criterios del Anexo V y la guía para el etiquetado.

No obstante, en casos excepcionales, cuando los preparados se fabriquen por pedidos en pequeñas cantidades, la inflamabilidad de dichas mezclas de gases se podrá evaluar siguiendo el siguiente método de cálculo:

La expresión de la mezcla de gases

$$A_1F_1+\ldots+A_iF_i+\ldots A_nF_n+B_1I_1+\ldots B_iI_i+\ldots B_pI_p$$

donde: A_i y B_i son las fracciones molares
F_i es el gas inflamable
I_i es el gas inerte
n es el número de gases inflamables
p es el número de gases inertes

se puede transformar en una fórmula en la que todos los gases inertes (I_i) se expresen en un equivalente de nitrógeno, utilizando un coeficiente K_i, y en la que el contenido equivalente de gas inflamable A_i se expresa del modo siguiente:

$$A'_i = A_i \times \left(\frac{100}{A_i+K_iB_i}\right)$$

Si se utiliza el valor del contenido máximo de gas inflamable que, en una mezcla con nitrógeno, produzca una composición no inflamable en el aire (Tci), se obtendrá la siguiente expresión:

$$\sum_i A'_i \int Tc \leq 1$$

La mezcla de gases será inflamable si el valor de la citada expresión es mayor que uno; entonces el preparado se clasificará como "extremadamente inflamable" y se le asignará la frase R12.

Coeficientes de equivalencia (Ki)

Los valores de los coeficientes de equivalencia K_i entre los gases inertes y el nitrógeno, y los de contenido máximo de gas inflamable (Tci) se basarán en las tablas 1 y 2 de la norma ISO: ISO 10156 edición 15.12.90.

Contenido máximo de gas inflamable (Tci)

El valor del contenido máximo de gas inflamable (Tci) se basará en la Tabla 2 de la norma ISO: ISO 10156 edición 15.12.90). Si hay algún valor del Tci de gas inflamable que no figure en dicha norma, se empleará el límite inferior de explosividad (LIE) que corresponda. Si no existe valor LIE, el valor del Tci quedará fijado en el 1% del volumen.

Observaciones

- La fórmula anterior se puede emplear para conseguir un correcto etiquetado de los preparados gaseosos, pero no debe tomarse como un método sustitutivo de los experimentos que se llevan a cabo para determinar los parámetros técnicos de seguridad.
- Además, esta fórmula no proporciona ningún dato sobre si las mezclas que contienen gases comburentes pueden prepararse con seguridad. Para calcular la inflamabilidad no se toman en consideración los gases comburentes.
- Dicha expresión proporcionará resultados fiables sólo en los casos en que los gases inflamables no tengan influencia unos en otros en lo que respecta a la inflamabilidad. Esto ha de tenerse en cuenta, por ejemplo, en el caso de los hidrocarburos halogenados.

9.1.1.2. Propiedades comburentes

Habida cuenta de que el Anexo V del presente Reglamento, no contiene un método para determinar las propiedades comburentes de las mezclas de gases, estas propiedades deberán evaluarse según el siguiente método de cálculo:

El principio del método consiste en comparar el potencial comburente de los gases que integran una mezcla con el potencial comburente del oxígeno en el aire. La concentración de gases en la mezcla se expresa en porcentaje de volumen.

Se considera que la mezcla gaseosa es tan comburente o más que el aire si se cumple la siguiente condición:

$$\sum_i x_i C_i \geq 21$$

donde: x_i es la concentración de gas i en % de volumen
C_i es el coeficiente de equivalencia de oxígeno

En tal caso, el preparado se clasificará como "comburente" y se le asignará la frase R8.

Coeficientes de equivalencia entre los gases comburentes y el oxígeno

Los coeficientes utilizados para calcular la capacidad comburente de ciertos gases integrantes de una mezcla con respecto a la capacidad comburente del oxígeno en el aire, que se enumeran en el apartado 5.2 de la norma ISO: ISO 10156 edición 15.12.90, son los siguientes:

O_2	1
N_2O	0,6

Cuando no exista un valor del coeficiente Ci para un gas en la norma citada, se atribuirá a este coeficiente un valor de 40.

9.1.2. **Evaluación de los efectos sobre la salud**

La evaluación del peligro para la salud que puede suponer un preparado se realizará conforme al apartado 3 del Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos.

Cuando ésta se lleve a cabo según el método convencional mencionado en el apartado 5 del Artículo 3 del mismo Reglamento, con referencia a los límites de concentración individuales, éstos se expresarán en porcentajes de volumen, y figurarán:

- en el Anexo I del presente Reglamento, para el o los gases considerados
- o en el Anexo I del Reglamento de preparados peligrosos (cuadros I A a VI A, cuando los gases considerados no figuren en el Anexo I, o figuren sin indicación de límites de concentración.

9.1.3. **Etiquetado**

Los requisitos de etiquetado para las bombonas portátiles de gas se verán satisfechos cuando sean conformes con la letra b) del apartado 4 del Artículo 8 del Reglamento de preparados peligrosos.

No obstante, como excepción a los apartados 1 y 2 del Artículo 8, en el caso de las bombonas de gas con una capacidad cúbica menor o igual a 150 l, el formato y dimensiones de la etiqueta se atendrá a lo dispuesto en la norma ISO: ISO/DP 7225. En tal caso, la etiqueta podrá llevar la denominación genérica o el nombre industrial o comercial del preparado, siempre que las

sustancias peligrosas que compongan el preparado estén indicadas en el cuerpo de la bombona de gas de forma clara e indeleble.

9.2. Aleaciones, preparados que contengan polímeros y preparados que contengan elastómeros

Estos preparados se clasificarán de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 3 del Reglamento de preparados peligrosos, bajo la forma en que están comercializados no presentan ningún peligro para la salud del hombre en caso de inhalación, ingestión o contacto con la piel. Por tanto, no es necesario etiquetar estos preparados según el Artículo 7. De todas formas, se comunicará al usuario profesional toda la información que debería figurar en la etiqueta, mediante un sistema de información en el formato establecido en el Artículo 10 del Reglamento antes citado.

9.3. Peróxidos orgánicos

Los peróxidos orgánicos combinan las propiedades de un comburente y un combustible en una sola molécula: cuando se descompone un peróxido orgánico, la parte comburente de la molécula reacciona exotérmicamente con la parte combustible. Los métodos existentes en el Anexo V no puede aplicarse a la determinación de las propiedades comburentes de los peróxidos orgánicos.

Deberá utilizarse el siguiente método de cálculo, basado en la presencia de oxígeno activo.

El contenido en oxígeno disponible (%) de un preparado de peróxido orgánico viene dado por la fórmula:

$$16 \times (ni \times ci/mi)$$

donde:

ni = número de grupos peróxido por molécula del peróxido orgánico i,
ci = concentración (peso %) del peróxido orgánico i,
mi = peso molecular del peróxido orgánico i.

A N E X O VII

"A N E X O VII A"

DATOS NECESARIOS PARA EL INFORME TECNICO (INFORME DE BASE) A QUE SE REFIERE EL APARTADO 1 DEL ARTICULO 7

Cuando no sea posible técnicamente o no parezca necesario desde el punto de vista científico proporcionar datos, habrán de indicarse las causas que lo justifiquen, causas que deberán ser aceptadas por las autoridades competentes.

Se citará el nombre del organismo u organismos responsables de los estudios.

0. IDENTIDAD DEL FABRICANTE Y DEL NOTIFICANTE; UBICACION DEL LUGAR DE PRODUCCION

Para las sustancias fabricadas fuera del Mercado Interior y para las que, a efectos de la notificación, se haya designado al notificante como único representante del fabricante se citarán la identidad y las direcciones de los importadores que introduzcan la sustancia en el Mercado Interior.

1. IDENTIDAD DE LA SUSTANCIA

1.1. Denominación

1.1.1. Denominación según la nomenclatura de la IUPAC

1.1.2. Otras denominaciones (denominación común, denominación comercial, abreviatura)

1.1.3. Número y nombre del CAS (si se dispone de ellos)

1.2. Fórmula molecular y fórmula estructural

1.3. Composición de la sustancia

1.3.1. Grado de pureza expresado en porcentaje

1.3.2. Naturaleza de las impurezas, comprendidos los isómeros y los subproductos

1.3.3. Porcentaje de las impurezas principales (significativas)

1.3.4. Cuando la sustancia contenga un estabilizante o un inhibidor o cualquier otro aditivo, indíquese claramente su naturaleza, el orden de magnitud:

..... ppm; ..... %

1.3.5. Datos espectrales (UV, IR, NMR o espectro de masa)

1.3.6. HPLC, GC

1.4. Métodos de detección y de determinación

Descripción completa de los métodos utilizados o indicaciones de las referencias bibliográficas.

Aparte de los métodos de detección y determinación, se proporcionará información sobre métodos analíticos que conozca el notificante y que permitan detectar una sustancia y sus productos de transformación tras su vertido en el medio ambiente y determinar los riesgos de exposición directa de los seres humanos.

2. INFORMACIONES RELATIVAS A LA SUSTANCIA

2.0. Producción

La información facilitada en este capítulo debería bastar para hacer posible una estimación aproximada pero realista de los riesgos que puede presentar para el hombre y para el medio ambiente el proceso de producción. No se piden detalles concretos del proceso de producción ni, en particular, que se revelen datos confidenciales desde el punto de vista comercial.

2.0.1. Procesos tecnológicos utilizados en la producción

2.0.2. Riesgo de exposición en relación con la producción:

- entorno de trabajo,
- medio ambiente.

2.1. Usos propuestos

La información facilitada en la presente sección debería bastar para hacer posible una estimación aproximada pero realista de los riesgos que puedan presentar las sustancias para el hombre y el medio ambiente, según los usos propuestos/previsibles.

2.1.1. Tipo de utilización: descripción de la función de la sustancia y de los efectos deseados

2.1.1.1. Proceso(s) tecnológico(s) relacionado(s) con el uso de la sustancia (cuando se conozcan)

2.1.1.2. Riesgo de exposición según el uso (cuando se conozca):

- entorno de trabajo,
- medio ambiente.

2.1.1.3. Forma de comercialización de la sustancia: sustancia, preparado, producto

2.1.1.4. Grado de concentración de la sustancia en los preparados o productos comercializados (cuando se conozca)

2.1.2. Desglose aproximado de los diferentes ámbitos de aplicación:

- industrias,
- agricultores y operarios cualificados,
- utilización por el público en general.

2.1.3. Cuando se conozcan y resulte pertinente, identidad de los clientes

2.1.4. Cantidades de residuos y composición de los residuos procedentes de los usos propuestos (cuando se conozcan)

2.2. Producción y/o importación prevista para cada una de las utilizaciones o campos de aplicación previstos

2.2.1. Producción y/o importación global en toneladas/año:

- el primer año civil,
- los siguientes años civiles.

Para las sustancias fabricadas fuera del Mercado Interior y para las que, a efectos de la notificación, se haya designado al notificante como único representante del fabricante, deberán comunicarse estos datos para cada uno de los importadores que figuren en el punto 0.

2.2.2. Producción y/o importación desglosada según los puntos 2.1.1 y 2.1.2, expresada en porcentajes:

- el primer año civil,
- los siguientes años civiles.

2.3. Métodos y precauciones recomendados en lo referente a:

2.3.1. - manipulación,

2.3.2. - almacenamiento,

2.3.3. - transporte,

2.3.4. - incendio (naturaleza de los gases de combustión o pirólisis cuando lo justifiquen los usos previstos).

2.3.5. Otros peligros, en especial reacción química con el agua

2.3.6. Cuando resulte pertinente, información relativa a la propensión de la sustancia a la explosión cuando se presenta en forma de polvo.

2.4. Medidas de urgencia en caso de vertido accidental

2.5. Medidas de urgencia en caso de daños a personas (por ejemplo, envenenamiento)

2.6. Envasado

3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA SUSTANCIA

3.0. Estado de la sustancia a 20° C y 101,3 kPa

3.1. Punto de fusión

3.2. Punto de ebullición

3.3. Densidad relativa

3.4. Presión de vapor

3.5. Tensión superficial

3.6. Hidrosolubilidad

3.8. Coeficiente de reparto n-octanol/agua

3.9. Punto de ignición

3.10. Inflamabilidad

3.11. Peligro de explosión

3.12. Temperatura de autoinflamabilidad

3.13. Propiedades comburentes

3.15. Granulometría:

Para las sustancias que puedan comercializarse en una forma que implique peligro de exposición por vía de inhalación, debe realizarse un ensayo al objeto de determinar el tamaño medio de las partículas de la sustancia tal como se comercialice.

4. ESTUDIOS TOXICOLOGICOS

4.1. Toxicidad aguda

Para las pruebas mencionadas en los puntos 4.1.1 a 4.1.3, las sustancias que no sean gases requerirán un mínimo de dos vías de administración, de las que una deberá ser oral. La elección de la segunda vía dependerá de las características de la sustancia y de la vía probable de contacto humano. Los gases y líquidos volátiles se administrarán mediante inhalación.

4.1.1. Administración oral

4.1.2. Administración por inhalación

4.1.3. Administración cutánea

4.1.5. Irritación de la piel

4.1.6. Irritación de los ojos

4.1.7. Sensibilización de la piel

4.2. Dosis repetida

La vía de administración deberá ser la más adecuada teniendo en cuenta la probable vía de contacto humano, la toxicidad aguda y las características de la sustancia. A falta de contraindicaciones, normalmente se preferirá la vía oral.

4.2.1. Toxicidad de dosis repetidas (28 días)

4.3. Otros efectos

4.3.1. Mutagénesis

La sustancia deberá examinarse mediante dos ensayos. Uno habrá de ser bacteriológico (mutación inversa), con y sin activación metabólica. El otro habrá de ser un ensayo no bacteriológico para detectar defectos o daños en los cromosomas. A falta de contraindicaciones, dicho ensayo deberá llevarse normalmente a cabo in vitro, tanto con activación metabólica como sin ella. En el supuesto de un resultado positivo en cualquiera de los ensayos, deberá hacerse un ensayo suplementario con arreglo al sistema descrito en el Anexo V.

4.3.2. Detección de la toxicidad para la reproducción (p.m.)

4.3.3. Valoración del comportamiento toxicocinético de la sustancia en la medida en que pueda deducirse de los datos del conjunto de base y de otros datos pertinentes.

5. ESTUDIOS ECOTOXICOLOGICOS

5.1. Efectos sobre los organismos

5.1.1. Toxicidad aguda para los peces

5.1.2. Toxicidad aguda para las dafnias

5.1.3. Prueba de inhibición del crecimiento de algas

5.1.6. Inhibición bacteriana

En los casos en los que la biodegradación pueda verse afectada por el efecto inhibitorio de la sustancia en las bacterias, habrá de realizarse un ensayo de inhibición bacteriana antes de llevarse a cabo los ensayos de biodegradación.

5.2. Degradación:

- Biótica

- Abiótica:

Si la sustancia no es fácilmente biodegradable, debería estudiarse la posibilidad de realizar el ensayo siguiente: hidrólisis en función del pH

5.3. Ensayo preliminar de absorción/desorción

6. POSIBILIDAD DE HACER INOFENSIVA LA SUSTANCIA

6.1. Industria/artesanado

6.1.1. Posibilidad de recuperación

6.1.2. Posibilidad de neutralización de los efectos desfavorables

6.1.3. Posibilidad de destrucción:

- vertido controlado,

- incineración,

- estación depuradora de aguas,

- otros.

6.2. Público en general

6.2.1. Posibilidad de recuperación

6.2.2. Posibilidad de neutralización de los efectos desfavorables

6.2.3. Posibilidad de destrucción:

- vertido controlado,

- incineración,

- estación depuradora de aguas,

- otros.

A N E X O VII B

DATOS NECESARIOS PARA EL INFORME TECNICO (INFORME DE BASE) A QUE SE REFIEREN LOS APARTADOS 1 Y 4 DEL ARTICULO 8

Cuando no sea posible técnicamente o no parezca necesario desde el punto de vista científico proporcionar datos, habrán de indicarse claramente las causas que lo justifiquen, causas que deberán ser aceptadas por la autoridad competente.

Se citará el nombre del organismo u organismos responsables de la realización de los estudios.

Además de la información solicitada a continuación, la Autoridad Competente podrá, si lo considera necesario para la valoración del riesgo, solicitar a los notificantes que proporcionen la siguiente información complementaria:

- presión de vapor,

- prueba de toxicidad aguda para las dafnias.

0. IDENTIDAD DEL FABRICANTE Y DEL NOTIFICANTE; UBICACION DEL LUGAR DE PRODUCCION

Para las sustancias fabricadas fuera del Mercado Interior y para las que, a efectos de la notificación, se haya designado al notificante como único representante del fabricante se citarán la identidad y las direcciones de los importadores que introduzcan la sustancia en el Mercado Interior.

1. IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA

1.1. Denominación

1.1.1. Denominación según la nomenclatura de la IUPAC

1.1.2. Otras denominaciones (denominación común, denominación comercial, abreviatura)

1.1.3. Número y nombre del CAS (si se dispone de ellos)

1.2. Fórmula molecular y fórmula estructural

1.3. Composición de la sustancia

1.3.1. Grado de pureza expresado en porcentaje (%)

1.3.2. Naturaleza de las impurezas, comprendidos los isómeros y los subproductos

1.3.4. Cuando la sustancia contenga un estabilizante o un inhibidor o cualquier otro aditivo, indíquese su naturaleza, el orden de magnitud:

..... ppm; ..... %

1.3.5. Datos espectrales (UV, IR, NMR o espectro de masa)

1.3.6. HPLC, GC

1.4. Métodos de detección y de determinación

Descripción completa de los métodos utilizados o indicaciones de las referencias bibliográficas.

Aparte de los métodos de detección y cuantificación, información sobre métodos analíticos que conozca el notificante que permitan la detección de una sustancia y sus productos de transformación tras su vertido al medio ambiente, o la determinación de los riesgos de exposición directa de los seres humanos a dicha sustancia.

2. INFORMACIONES RELATIVAS A LA SUSTANCIA

2.0. Producción

La información que aporta la presente sección debería ser suficiente para permitir evaluar, de forma aproximada pero realista, los riesgos que el proceso de producción puede presentar para el hombre y para el medio ambiente. No se exigirán detalles exactos relativos al proceso de fabricación, en particular los que sean particularmente delicados desde el punto de vista comercial.

2.0.1. Proceso tecnológico utilizados en la producción.

2.0.2. Estimación del riesgo de exposición en relación con la producción:

- entorno de trabajo,
- medio ambiente.

2.1. Utilización propuesta

La información que aporta la presente sección debería ser suficiente para permitir evaluar, de forma aproximada pero realista, los riesgos que puedan presentar para el hombre y para el medio ambiente las sustancias, habida cuenta de la utilización prevista/previsible.

2.1.1. Tipo de utilización: descripción de la función de la sustancia y de los efectos deseados

2.1.1.1. Proceso(s) tecnológico(s) con el uso de la sustancia (cuando se conozcan)

2.1.1.2. Riesgo de exposición en función del uso de la sustancia (cuando se conozca):

- entorno de trabajo,

- medio ambiente.

2.1.1.3. Forma de comercialización de la sustancia: sustancia, preparado, producto

2.1.1.4. Grado de concentración de la sustancia en los preparados o productos comercializados (cuando se conozca)

2.1.2. Desglose aproximado de los diferentes ámbitos de aplicación:

- industrias,

- agricultores y operarios cualificados,

- utilización por el público en general.

2.1.3. Cuando se conozca y resulte pertinente, identidad de los clientes.

2.2. Producción y/o importación prevista para cada una de las utilizaciones o campos de aplicación previstos

2.2.1. Producción y/o importación global en toneladas/año:

- el primer año civil,

- los siguientes años civiles.

Para las sustancias fabricadas fuera del Mercado Interior y para las que, a efectos de la notificación, se haya designado al notificante como único representante del fabricante, deberán comunicarse estos datos para cada uno de los importadores que figuren en el punto 0.

2.2.2. Producción y/o importación desglosada según los puntos 2.1.1 y 2.1.2, expresada en porcentajes:

- el primer año civil,

- los siguientes años civiles.

2.3. Métodos y precauciones recomendados en lo referente a:

2.3.1. - manipulación,

2.3.2. - almacenamiento,

2.3.3. - transporte,

2.3.4. - caso de incendio (naturaleza de los gases de combustión o pirólisis cuando lo justifiquen los uso previstos).

2.3.5. Otros peligros, en especial reacción química con el agua.

2.4. Medidas de emergencia en caso de vertido accidental

2.5. Medidas de emergencia en caso de daños corporales (por ejemplo, envenenamiento)

2.6. Envasado

3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA SUSTANCIA

3.0. Estado de la sustancia a 20°C y 101,3 kPa

3.1. Punto de fusión

3.2. Punto de ebullición

3.6. Hidrosolubilidad

3.8. Coeficiente de reparto n-octanol/agua

3.9. Punto de ignición

3.10. Inflamabilidad

4. ESTUDIOS TOXICOLOGICOS

4.1. Toxicidad aguda

Para las pruebas 4.1.1. a 4.1.2 bastará con una vía de administración. Las sustancias que no sean gases requerirán pruebas de administración oral. Los gases se ensayarán por inhalación.

4.1.1. Administración oral

4.1.2. Administración por inhalación

4.1.5. Irritación de la piel

4.1.6. Irritación de ojos

4.1.7. Sensibilización de la piel

4.3. Otros efectos

4.3.1. Mutagénesis

La sustancia deberá examinarse mediante un ensayo bacteriológico (mutación inversa), con y sin activación metabólica.

5. ESTUDIOS ECOTOXICOLOGICOS

5.2. Degradación:

- Biótica.

ANEXO VII C

DATOS NECESARIOS PARA EL INFORME TECNICO (INFORME DE BASE) A QUE SE REFIERE EL APARTADO 3 DEL ARTICULO 8

Cuando no sea posible técnicamente o no parezca necesario desde el punto de vista científico proporcionar datos, habrán de indicarse claramente las causas que lo justifiquen, causas que deberán ser aceptadas por la autoridad competente.

Se citarán el nombre del organismo u organismos responsables de los estudios.

0. IDENTIDAD DEL FABRICANTE Y DEL NOTIFICANTE, SI NO SE TRATA DE LA MISMA PERSONA; UBICACION DEL LUGAR DE PRODUCCION

Para las sustancias fabricadas fuera del Mercado Interior y para las que, a efectos de la notificación, se haya designado al notificante como único representante del fabricante se citarán la identidad y las direcciones de los importadores que introduzcan la sustancia en el Mercado Interior.

1. IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA

1.1. Denominación

1.1.1. Denominación según la nomenclatura de la IUPAC

1.1.2. Otras denominaciones (denominación común, denominación comercial, abreviatura)

1.1.3. Número y nombre del CAS (si se dispone de ellos)

1.2. Fórmula molecular y fórmula estructural

1.3. Composición de la sustancia

1.3.1. Grado de pureza expresado en porcentaje (%)

1.3.2. Naturaleza de las impurezas, comprendidos los isómeros y los subproductos

1.3.3. Porcentaje de las impurezas principales (significativas)

1.3.4. Cuando la sustancia contenga un estabilizante o un inhibidor o cualquier otro aditivo, indíquese su naturaleza, el orden de magnitud:

..... ppm, ... %

1.3.5. Datos espectrales (UV, IR, NMR o espectro de masa)

1.3.6. HPLC, GC

1.4. Métodos de detección y de determinación

Descripción completa de los métodos utilizados o indicación de las referencias bibliográficas.

Aparte de los métodos de detección y cuantificación, información sobre los métodos de análisis conocidos por el notificante que permitan la detección de una sustancia y de sus productos de transformación tras el vertido de ésta al medio ambiente o la determinación del riesgo de exposición directa de los seres humanos a dicha sustancia.

2. INFORMACIONES RELATIVAS A LA SUSTANCIA

2.0. Producción

La información que aporta la presente sección debería ser suficiente para permitir evaluar, de forma aproximada pero realista, los riesgos que el proceso de producción puede presentar para el hombre y para el medio ambiente. No se exigirán detalles exactos relativos al proceso de fabricación, en particular los que sean particularmente delicados desde el punto de vista comercial.

2.0.1. Proceso(s) tecnológico(s) utilizado(s) en la producción

2.0.2. Estimación del riesgo de exposición en relación con la producción:

- entorno de trabajo,

- medio ambiente.

2.1. Utilización prevista

La información que aporta la presente sección debería ser suficiente para permitir evaluar, de forma aproximada pero realista, los riesgos que puedan presentar para el hombre y para el medio ambiente las sustancias, habida cuenta de la utilización prevista/previsible.

2.1.1. Tipo de utilización: descripción de la función de la sustancia y de los efectos deseados

2.1.1.1. Proceso(s) tecnológico(s) relacionado(s) con el uso de la sustancia (cuando se conozcan)

2.1.1.2. Riesgo de exposición en función del uso de la sustancia (cuando se conozca):

- entorno de trabajo,

- medio ambiente.

2.1.1.3. Forma de comercialización de la sustancia: sustancia, preparado, producto

2.1.1.4. Grado de concentración de la sustancia de los preparados y productos comercializados (cuando se conozca)

2.1.2. Desglose aproximado de los ámbitos de aplicación:

- industrias,

- agricultores y operarios cualificados,

- utilización por el público en general.

2.1.3. Cuando se conozca y resulte pertinente, identidad de los clientes

2.2. Producción y/o importación prevista para cada una de las utilizaciones o campos de aplicación previstos

2.2.1. Producción y/o importación global anual en toneladas:

- el primer año civil,

- los siguientes años civiles.

Para las sustancias fabricadas fuera del Mercado Interior y para las que, a efectos de la notificación, se haya designado al notificante como único representante del fabricante, deberán comunicarse estos datos para cada uno de los importadores que figuren en el punto 0.

2.2.2. Producción y/o importación desglosada según los puntos 2.1.1. y 2.1.2., expresada en porcentajes:

- el primer año civil,

- los siguientes años civiles.

2.3. Métodos y precauciones recomendadas en lo referente a:

2.3.1. - manipulación,

2.3.2. - almacenamiento,

2.3.3. - transporte,

2.3.4. - caso de incendio (naturaleza de los gases de combustión o pirólisis cuando lo justifiquen los usos previstos).

2.3.5. Otros peligros, en especial reacción química con el agua

2.4. Medidas de emergencia en caso de vertido accidental

2.5. Medidas de emergencia en caso de daños corporales (por ejemplo, envenenamiento)

2.6. Envasado

3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA SUSTANCIA

3.0. Estado de la sustancia a 20°C y 101,3 kPa

3.9. **Punto de ignición**

3.10. Inflamabilidad

4. ESTUDIOS TOXICOLOGICOS

4.1. **Toxicidad aguda**

Basta una vía de administración. Las sustancias distintas de los gases requerirán pruebas de administración oral. Los gases se ensayarán por inhalación.

4.1.1. Administración oral

4.1.2. Administración por inhalación.

"ANEXO VII D"

DISPOSICIONES ESPECIALES RELATIVAS A LOS EXPEDIENTES TECNICOS ("CONJUNTO BASICO") CONTENIDOS EN LAS NOTIFICACIONES MENCIONADAS EN EL ARTICULO 12

A. A efectos del presente anexo

- "homopolímero" es un polímero que consiste en un solo tipo de unidad monomérica.
- "copolímero" es un polímero que consiste en más de un tipo de unidad monomérica.
- "polímero para el que resulta aceptable un conjunto reducido de ensayos" o "polímero RTP" es un polímero que satisface los criterios fijados en C-2.
- "familia de polímeros" es un grupo de polímeros (bien homolpolímeros, bien copolímeros) con diferentes pesos moleculares medios en número o diferentes composiciones resultantes de diferentes cocientes de unidades monoméricas. La diferencia en el peso molecular medio en número o en la composición viene determinada, no por fluctuaciones involuntarias en relación con el proceso, sino por alteraciones deliberadas de las condiciones del proceso, manteniéndose este último invariable,
- "Mn" es el peso molecular medio en número.
- "M" es el peso molecular.

B. Enfoque por familias

Para evitar notificaciones y ensayos innecesarios, se podrán agrupar los polímeros en familias.

El concepto consiste en someter a ensayos miembros representativos de una familia con:

- Mn variable para los homopolímeros o
- composición variable con Mn de los copolímeros aproximadamente constante, o
- para Mn > 1000, Mn variable con composición de los copolímeros aproximadamente constante.

En determinados casos en los que haya disemejanzas en los efectos observados en los miembros representativos, dependiendo del intervalo de Mn o de composición, se exigirán notificaciones y ensayos adicionales de otros miembros representativos.

C. Información exigida para el expediente técnico mencionado en el artículo 12

Si no es técnicamente posible o no resulta necesario desde el punto de vista técnico dar información, se indicarán claramente las razones, que estarán sometidas a la aceptación por parte de las autoridades competentes.

Se podrá tener en cuenta para la evaluación de las propiedades del polímero la información adecuada disponible sobre las propiedades del monómero o monómeros.

Sin perjuicio de las disposiciones del apartado 1 del artículo 3 de este Reglamento, los ensayos se harán con arreglo a métodos reconocidos y recomendados por los organismos internacionales competentes en caso de que existan esas recomendaciones.

Se mencionará el nombre del organismo u organismos responsables de realizar los estudios.

C.1. POLIMEROS CON CONJUNTO ESTANDAR DE ENSAYOS

Además de la información y los ensayos mencionados en el número 1 del artículo 7, establecido en el anexo VII A, se exigirá la información siguiente, específica del polímero:

C.1.1. <u>Polímeros comercializados en la Comunidad en cantidades ≥ 1 t/año en cantidades totales ≥ 5 t</u>

1. IDENTIDAD
1.2.1 Peso molecular medio en número
1.2.2 Distribución por peso molecular (MWD)
1.2.3 Identidad y concentración de los monómeros de partida y de las sustancias de partida que tengan enlaces con el polímero
1.2.4 Indicación de los grupos terminales e identidad y frecuencia de los grupos reactivos funcionales
1.3.2.1 Identidad de los monómeros no reactados
1.3.3.1 Porcentaje de los monómeros no reactados

2. INFORMACION RELATIVA A LA SUSTANCIA

2.1.1.5 Declaración con información pertinente, si el polímero se ha desarrollado de forma que sea ambientalmente degradable

3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA SUSTANCIA
3.6.1 Extractividad con agua

Sin perjuicio del apartado 1 del artículo 16 de este Reglamento, podrán exigirse otros ensayos adicionales en determinados casos, p.ej.:

- Estabilidad a la luz si el polímero no está específicamente estabilizado frente a la luz
- Extractividad a largo plazo (ensayo de lixiviados); dependiendo del resultado de este ensayo, podrán exigirse ensayos adecuados sobre el lixiviado, caso por caso.

C.1.2. <u>Polímeros comercializados en la Comunidad en cantidades < 1 t/año en cantidades totales < 5 t por ≥ 100 kg/año o ≥ 500 kg en total</u>

Además de la información y los ensayos mencionados en el apartado 1 del artículo 8, establecidos en el anexo VII B, se exigirá la información siguiente, específica del polímero:

1. IDENTIDAD DE LA SUSTANCIA
1.2.1 Peso molecular medio en número
1.2.2 Distribución por peso molecular (MWD)
1.2.3 Identidad y concentración de los monómeros de partida y de las sustancias de partida que tengan enlaces con el polímero
1.2.4 Indicación de los grupos terminales e identidad y frecuencia de los grupos reactivos funcionales
1.3.2.1 Identidad de los monómeros no reactados
1.3.3.1 Porcentaje de los monómeros no reactados

2. INFORMACION RELATIVA A LA SUSTANCIA
2.1.1.5 Declaración con información pertinente, si el polímero se ha desarrollo de forma que sea ambientalmente degradable.

3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA SUSTANCIA
3.6.1 Extractividad con agua

C.1.3. <u>Polímeros comercializados en la Comunidad en cantidades < 100 kg/año en cantidades totales < 500 kg</u>

Además de la información y los ensayos mencionados en el apartado 2 del artículo 8, establecido en el anexo VII C, se exigirá la información siguiente, específica del polímero:

1. IDENTIDAD DE LA SUSTANCIA
1.2.1 Peso molecular medio en número
1.2.2 Distribución por peso molecular (MWD)
1.2.3 Identidad y concentración de los monómeros de partida y de las sustancias de partida que tengan enlaces con el polímero
1.2.4 Indentidad de los grupos terminales e identidad y frencuencia de los grupos reactivos funcionales
1.3.2.1 Identidad de los monómeros no reactados
1.3.3.1 Porcentaje de los monómeros no reactados

2. INFORMACION RELATIVA A LA SUSTANCIA
2.1.1.5 Declaración con información pertinente, si el polímero se ha desarrollado de forma que sea ambientalmente degradable

C.2. POLIMEROS EN LOS QUE PUEDE ACEPTARSE UN NUMERO REDUCIDO DE ENSAYOS

En ciertas condiciones puede reducirse el conjunto básico de ensayos para polímeros.

Las sustancias con elevado peso molecular medio en número, bajo contenido de especies con bajo peso molecular medio en número y baja solubilidad/extractividad se considerarán como no

biodisponibles. Por consiguiente, para determinar en qué polímeros se puede aceptar un conjunto reducido de ensayos, se utilizarán los criterios siguientes:

Para los polímeros no fácilmente degradables comercializados en la Comunidad en cantidad ≥ 1 t/a o cantidades totales ≥ 5 t, los polímeros en los que se puede aceptar un conjunto reducido de ensayos vienen definidos por los criterios siguientes:

I Elevado peso molecular medio en número (Mn)

II Extractividad en agua (3.6.1.)
< 10 mg/l excluida cualquier contribución de aditivos e impurezas

III Menos de 1% con peso molecular < 1000; el porcentaje se refiere sólo a moléculas (componentes) directamente derivados de monómeros, incluidos éstos y excluidos otros componentes, p.ej., aditivos o impurezas;

Si se satisfacen todos los criterios, el polímero se considerará como un polímero en el que puede aceptar un conjunto reducido de ensayos.

En el caso de polímeros no fácilmente degradables comercializados en la Comunidad en cantidad < 1 t/a o cantidades totales < 5 t, es suficiente que se cumplan los criterios I y II para considerar que es un polímero en el que se puede aceptar un conjunto reducido de ensayos.

Si no es posible verificar los criterios con los ensayos asignados, el notificador tendrá que demostrar por otros medios que satisface los criterios.

En determinadas circunstancias, se exigirán ensayos de toxicología y ecotoxicología.

C.2.1 Polímeros comercializados en la Comunidad en cantidad ≥ 1 t/año o cantidades totales ≥ 5 t

0. IDENTIDAD DEL FABRICANTE E IDENTIDAD DEL NOTIFICADOR: LOCALIZACION DEL SITIO DE PRODUCCION

En el caso de sustancias fabricadas fuera de la Comunidad y para las que, a efectos de notificación, se ha designado al notificador como el único representante del fabricante, identidad y direcciones de los importadores que introducirán la sustancia en la Comunidad.

1. IDENTIDAD DE LA SUSTANCIA

1.1 Denominación
1.1.1 Denominación en la nomenclatura IUPAC
1.1.2 Otras denominaciones (denominación usual, denominación comercial, abreviatura)
1.1.3 Número y nombre del CAS (si se dispone de ellos)
1.2 Fórmula molecular y fórmula estructural
1.2.1 Peso molecular medio en número
1.2.2 Distribución por peso molecular (MWD)
1.2.3 Identidad y concentración de los monómeros de partida y de las sustancias de partida que tendrán enlaces con el polímero
1.2.4 Identidad de los grupos terminales e identidad y frencuencia de los grupos reactivos funcionales
1.3 Composición de la sustancia
1.3.1 Grado de pureza expresado en porcentaje
1.3.2 Naturaleza de las impurezas, incluidos los subproductos
1.3.2.1 Identidad de los monómeros no reactados
1.3.3 Porcentaje de las impurezas principales (significativas)
1.3.3.1 Porcentaje de los monómeros no reactados
1.3.4 Cuando la sustancia contenga un estabilizante o un inhibidor o cualquier otro aditivo, indíquese la naturaleza y el orden de magnitud: ... ppm, ... %
1.3.5 Datos espectrales (UV, IR, RMN o espectro de masa)
1.3.6.1 GPC
1.4 Métodos de detección y determinación
Descripción completa de los métodos utilizados o referencias bibliográficas apropiadas
Aparte de los métodos de detección y determinación, se proporcionará información sobre métodos analíticos que conozca el notificante y que permitan detectar una sustancia y sus productos de transformación tras su vertido en el medio ambiente y determinar los riesgos de exposición directa de los seres humanos.

2. Información sobre la sustancia
2.0 Producción
La información facilitada en este capítulo debería bastar para hacer posible una estimación aproximada pero realista de los riesgos que puede presentar para el hombre y para el medio ambiente el proceso de producción. No se piden detalles concretos del proceso de producción ni, en particular, que se revelen datos confidenciales desde el punto de vista comercial.
2.0.1 Procesos tecnológicos utilizados en la producción
2.0.2 Riesgo de exposición en relación con la producción:
- entorno de trabajo
- medio ambiente
2.1 Usos propuestos
La información facilitada en este capítulo debería bastar para hacer posible una estimación aproximada pero realista de los riesgos que puede presentar para el hombre y para el medio ambiente, según los usos propuestos/previsibles.
2.1.1 Tipos de utilización: descripción de la función y los efectos deseados
2.1.1.1 Procesos tecnológicos relacionados con el uso de la sustancia (cuando se conozcan)
2.1.1.2 Riesgo de exposición según el uso (cuando se conozca)
- entorno de trabajo
- medio ambiente
2.1.1.3 Forma de comercialización de la sustancia: sustancia, preparado, producto
2.1.1.4 Concentración de la sustancia en los preparados y productos comercializados.(cuando se conozca)
2.1.2 Desglose aproximado de los diferentes ámbitos de aplicación:
- industrias
- agricultores y operarios cualificados
- utilización por el público en general
2.1.3 Cuando se conozcan y resulte pertinente, identidad de los receptores de la sustancia
2.1.4 Cantidades de residuos y composición de los residuos procedentes de los usos propuestos (cuando se conozcan)
2.2 Producción o importación prevista para cada una de las utilizaciones o campos de aplicación previstos
2.2.1 Producción o importación global en toneladas/año:
- primer año civil
- los siguientes años civiles
En el caso de sustancias fabricadas fuera de la Comunidad y para las que, a efectos de notificación, se ha designado al notificador como el único representante del fabricante, se proporcionará esta información para cada uno de los importadores identificados en la sección 0 anterior.
2.2.2 Producción o importación, desglosada con arreglo a 2.1.1 y 2.1.2, expresada en porcentaje:
- el primer año civil
- años civiles siguientes
2.3 Métodos y precauciones recomendados en lo referente a:
2.3.1 Manipulación
2.3.2 Almacenamiento
2.3.3 Transporte
2.3.4 Incendio (naturaleza de los gases de combustión o pirólisis cuando lo justifiquen los usos previstos)
2.3.5 Otros peligros, en especial, reacción química con el agua
2.3.6 Cuando resulte pertinente, información relativa a la propensión de la sustancia a la explosión cuando se presenta en forma de polvo
2.4 Medidas de urgencia en caso de dispersión accidental
2.5 Medidas de urgencia en caso de daños a personas (p.ej., envenenamiento)
2.6 Envasado

3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA SUSTANCIA
3.0 Estado de la sustancia a 20° C y 101'3 kPa
3.1 Intervalo de fusión (p.ej. a partir del ensayo de estabilidad térmica)
3.3 Densidad relativa
3.6.1 Extractividad con agua
3.10 Inflamabilidad
3.11 Propiedades explosivas
3.12 Autoinflamabilidad
3.15 Granulometría:
En el caso de las sustancias que pueden comercializarse en una forma que plantee riesgo de exposición por vía inhalatoria, se hará un ensayo para determinar la granulometría de la sustancia tal como vaya a comercializarse.
3.16 Estabilidad térmica
3.17 Extractividad con:
- agua a pH 2 y 9 a 37° C
- ciclohexano

4. ESTUDIOS TOXICOLOGICOS

Caso por caso, la autoridad competente puede exigir determinados ensayos, sin retrasar la aceptación de la notificación, dependiendo de la presencia de grupos reactivos o de características estructurales o físicas o del conocimiento de las propiedades de componentes de bajo peso molecular del polímero o posibilidad de exposición, a saber, ensayos de toxicidad por inhalación (p.ej., 4.1.2, 4.2.1) si hay posibilidad de exposición.

5. ESTUDIOS ECOTOXICOLOGICOS

Caso por caso, la autoridad competente puede exigir determinados ensayos, sin retrasar la aceptación de la notificación, dependiendo de la presencia de grupos reactivos o de características estructurales o físicas o del conocimiento de las propiedades de componentes de bajo peso molecular del polímero o posibilidad de exposición.

En ciertos casos, podrán exigirse además los ensayos siguientes:

- Estabilidad a la luz, si el polimero no ha sido especificamente estabilizado frente a la luz

- Extractividad a largo plazo (ensayo de lixiviados) Dependiendo de los resultados de este ensayo, podrán solicitarse cualesquiera otros ensayos en el lixiviado, caso por caso.

6. POSIBILIDAD DE HACER INOFENSIVA LA SUSTANCIA
6.1 Industria/artesanado
6.1.1 Posibilidad de recuperación
6.1.2 Posibilidad de neutralización de los efectos desfavorables
6.1.3 Posibilidad de destrucción:
- vertido controlado
- incineración
- estación depuradora de aguas
- otros
6.2 Público en general
6.2.1 Posibilidad de recuperación
6.2.2 Posibilidad de neutralización de los efectos desfavorables
6.2.3 Posibilidad de destrucción:
- vertido controlado
- incineración
- estación depuradora de aguas
- otros

C.2.2 Polimeros comercializados en la Comunidad en cantidad < 1 t/año o cantidades totales < 5 t

0. IDENTIDAD DEL FABRICANTE E IDENTIDAD DEL NOTIFICADOR: LOCALIZACION DEL SITIO DE PRODUCCION

En el caso de sustancias fabricadas fuera de la Comunidad y para las que, a efectos de notificación, se ha designado al notificador como el único representante del fabricante, identidad y direcciones de los importadores que introducirán la sustancia en la Comunidad.

1. IDENTIDAD DE LA SUSTANCIA
1.1 Denominación
1.1.1 Denominación en la nomenclatura IUPAC
1.1.2 Otras denominaciones (denominación usual, denominación comercial, abreviatura)
1.1.3 Número y nombre del CAS (si se dispone de ellos)
1.2 Fórmula molecular y fórmula estructural
1.2.1 Peso molecular medio en número
1.2.2 Distribución por peso molecular (MWD)
1.2.3 Identidad y concentración de los monómeros de partida y de las sustancias de partida que tendrán enlaces con el polimero
1.2.4 Identidad de los grupos terminales e identidad y frencuencia de los grupos reactivos funcionales
1.3 Composición de la sustancia
1.3.1 Grado de pureza expresado en porcentaje
1.3.2 Naturaleza de las impurezas, incluidos los subproductos

1.3.2.1 Identidad de los monómeros no reactados
1.3.3 Porcentaje de las impurezas principales (significativas)
1.3.3.1 Porcentaje de los monómeros no reactados
1.3.4 Cuando la sustancia contenga un estabilizante o un inhibidor o cualquier otro aditivo, indíquese la naturaleza y el orden de magnitud: ... ppm, ... %
1.3.5 Datos espectrales (UV, IR, RMN o espectro de masa)
1.3.6.1 GPC

1.4 Métodos de detección y determinación
Descripción completa de los métodos utilizados o referencias bibliográficas apropiadas
Aparte de los métodos de detección y determinación, se proporcionará información sobre métodos analíticos que conozca el notificante y que permitan detectar una sustancia y sus productos de transformación tras su vertido en el medio ambiente y determinar los riesgos de exposición directa de los seres humanos.

2. INFORMACION DE LA SUSTANCIA

2.0 Producción
La información facilitada en este capitulo deberia bastar para hacer posible una estimación aproximada pero realista de los riesgos que puede presentar para el hombre y para el medio ambiente el proceso de producción. No se piden detalles concretos del proceso de producción ni, en particular, que se revelen datos confidenciales desde el punto de vista comercial.
2.0.1 Procesos tecnológicos utilizados en la producción
2.0.2 Riesgo de exposición en relación con la producción:
- entorno de trabajo
- medio ambiente

2.1 Usos propuestos
La información facilitada en este capitulo deberia bastar para hacer posible una estimación aproximada pero realista de los riesgos que puede presentar para el hombre y para el medio ambiente, según los usos propuestos/previsibles.
2.1.1 Tipos de utilización: descripción de la función y los efectos deseados
2.1.1.1 Procesos tecnológicos relacionados con el uso de la sustancia (cuando se conozcan)
2.1.1.2 Riesgo de exposición según el uso (cuando se conozca)
- entorno de trabajo
- medio ambiente
2.1.1.3 Forma de comercialización de la sustancia: sustancia, preparado, producto
2.1.1.4 Concentración de la sustancia en los preparados y productos comercializados (cuando se conozca)
2.1.2 Desglose aproximado de los diferentes ámbitos de aplicación:
- industrias
- agricultores y operarios cualificados

- utilización por el público en general
2.1.3 Cuando se conozcan y resulte pertinente, identidad de los receptores de la sustancia
2.1.4 Cantidades de residuos y composición de los residuos procedentes de los usos propuestos (cuando se conozcan)

2.2. Producción o importación prevista para cada una de las utilizaciones o campos de aplicación previstos
2.2.1 Producción o importación global en toneladas/año:
- primer año civil
- los siguientes años civiles

En el caso de sustancias fabricadas fuera de la Comunidad y para las que, a efectos de notificación, se ha designado al notificador como el único representante del fabricante, se proporcionará esta información para cada uno de los importadores identificados en la sección 0 anterior.

2.2.2 Producción y/o importación desglosada según los puntos 2.1.1 y 2.1.2, expresada en porcentajes:
- el primer año civil,
- los siguientes años civiles.

2.3 Métodos y precauciones recomendados en lo referente a:
2.3.1 Manipulación
2.3.2 Almacenamiento
2.3.3 Transporte
2.3.4 Incendio (naturaleza de los gases de combustión o pirólisis cuando lo justifiquen los usos previstos)
2.3.5 Otros peligros, en especial, reacción quimica con el agua
2.3.6 Cuando resulte pertinente, información relativa a la propensión de la sustancia a la explosión cuando se presenta en forma de polvo

2.4 Medidas de urgencia en caso de dispersión accidental

2.5 Medidas de urgencia en caso de daños a personas (p.ej., envenenamiento)

2.6 Envasado

3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA SUSTANCIA

3.0 Estado de la sustancia a 20° C y 101'3 kPa

3.1 Intervalo de fusión (p.ej., a partir del ensayo de estabilidad térmica)

3.6.1 Extractividad con agua

3.10 Inflamabilidad

"ANEXO VIII

DATOS Y ENSAYOS COMPLEMENTARIOS EXIGIDOS CONFORME AL APARTADO 2 DEL ARTICULO 7

Cuando no sea posible técnicamente o no parezca necesario desde el punto de vista cientifico proporcionar datos, habrán de indicarse claramente las causas que lo justifiquen, causas que deberán ser aceptadas por la autoridad competente.

Se citará el nombre del organismo u organismos responsables de la realización de los estudios.

NIVEL 1

1. Estudios fisico-quimicos

Estudios adicionales sobre propiedades fisico-quimicas en función de los resultados de los estudios a que se refiere el Anexo VII. Dichos estudios adicionales podrian incluir, por ejemplo, el desarrollo de métodos analiticos que posibiliten la observación y detección de una sustancia o de sus productos de transformación y estudios sobre productos de descomposición térmica.

2. Estudios toxicológicos

Estudio de fertilidad (una especie, una generación, machos y hembras, via de administración más adecuada).

Cuando sean dudosos los resultados obtenidos respecto a la primera generación, será necesario proceder al estudio de una segunda generación.

Mediante la planificación de las dosis será posible obtener a través de dicho estudio indicaciones de potencial teratogénico. Cuando se presenten indicios de potencial teratogénico debería realizarse un estudio completo desde el punto de vista teratológico.

a) Estudio de teratogénesis (una especie, vía de administración más adecuada).

Este estudio será necesario cuando no se haya examinado el potencial teratogénico en el estudio de fertilidad precedente.

b) Estudio de toxicidad subcrónica y/o crónica, con inclusión de estudios especiales (una especie, machos y hembras, vía de administración más adecuada). Este estudio será necesario si los resultados del estudio de dosis repetidas del Anexo VII o cualquier información pertinente indican la necesidad de ir más adelante en las investigaciones.

Entre los efectos que indican la necesidad de proceder a tal estudio podrían incluirse, por ejemplo:

1º lesiones graves o irreversibles;

2º un nivel "sin efecto" muy bajo o la falta de nivel "sin efecto";

3º una relación clara de estructura química entre la sustancia estudiada y otras sustancias existentes cuya peligrosidad se haya probado.

c) Ensayos adicionales de mutagénesis y/o estudios de detección de carcinogénesis como se prescribe en los sistemas de ensayo descritos en el Anexo V.

Cuando los dos ensayos del informe de base den resultados negativos, deberán realizarse ensayos suplementarios en función de las propiedades específicas y de la utilización prevista de la sustancia.

Cuando uno o los dos ensayos del informe de base den resultados positivos, el estudio suplementario debería incluir los mismos o diferentes fines en otros métodos de ensayo in vivo".

d) Datos toxicocinéticos básicos.

3. **Estudios ecotoxicológicos**

a) Estudio de toxicidad prolongada con Daphnia magna (21 días).

b) Ensayo sobre vegetales superiores.

c) Ensayo sobre lombrices de tierra.

d) Estudio de toxicidad prolongada con peces.

e) Ensayo de acumulación en una especie: una especie, preferentemente peces.

f) Estudio(s) adicional(es) de biodegradación, cuando los estudios prescritos en el Anexo VII no hubieran probado una degradación suficiente.

g) Estudio(s) complementario(s) de absorción/desorción en función de los resultados de las investigaciones a que se refiere el Anexo VII.

NIVEL 2

1. Estudios toxicológicos

El programa de ensayos habrá de abarcar los aspectos que a continuación se reseñan, salvo cuando existan razones válidas para excluirlos, y se dé justificación de dichas razones:

a) Estudio de toxicidad crónica.

b) Estudio de carcinogénesis.

c) Estudio de fertilidad (por ejemplo, estudio de reproducción en tres generaciones); sólo cuando se haya observado un efecto sobre la fertilidad en el nivel 1.

d) Estudio de toxicidad relativo a los efectos sobre el desarrollo perinatal y postnatal.

e) Estudio del potencial teratogénico (especies no empleadas en el nivel 1).

f) Estudios toxicocinéticos adicionales que incluyan la biotransformación y la farmacocinética.

g) Ensayos suplementarios para investigar la toxicidad para los órganos o sistemas.

2. **Estudios ecotoxicológicos**

a) Ensayos suplementarios de acumulación, degradación, movilidad y absorción/desorción.

b) Estudios complementarios de toxicidad con peces.

c) Estudios de toxicidad con aves.

d) Estudios suplementarios de toxicidad con otros organismos."

ANEXO IX

PARTE A

Disposiciones relativas a los cierres de seguridad para niños.

1. Envases que pueden volver a cerrarse.

Los cierres de seguridad para niños que se empleen en envases que pueden volver a cerrarse deberán ajustarse a la norma ISO 8317 (edición de 1 de julio de 1.989) sobre "Envases de seguridad a prueba de niños - Requisitos y métodos de ensayo para envases que pueden volver a cerrarse" adoptada por la Organización Internacional de Normalización (ISO).

2. Envases que no pueden volver a cerrarse (p.m)

3. Observaciones.

a) Sólo podrán certificar la conformidad con la mencionada norma aquellos laboratorios que hayan demostrado que cumplen las normas europeas EN de la serie 45.000

b) Casos particulares.

Cuando parezca evidente que un envase es suficientemente seguro para los niños, en particular porque éstos no pueden acceder a su contenido sin ayuda de un instrumento, podrá omitirse el ensayo.

En todos los demás casos, y cuando existan motivos válidamente justificados para dudar de la eficacia del cierre de seguridad utilizado a prueba de niños, la autoridad nacional podrá solicitar al responsable de la comercialización un certificado, emitido por un laboratorio de ensayo del tipo definido en el punto 1, que certifique:

1º Que el tipo de cierre utilizado es tal que no es preciso efectuar ensayos conforme a la norma ISO anteriormente mencionada.

o

2º Que el cierre de que se trata, una vez sometido a los ensayos establecidos por la norma ISO anteriormente mencionada, es conforme a las prescripciones establecidas.

PARTE B

Disposiciones relativas a los dispositivos que permiten detectar los peligros al tacto.

Las especificaciones técnicas en relación con los dispositivos que permiten detectar los peligros al tacto deberán ajustarse a la norma EN 272 (edición de 20 de agosto de 1.989) sobre las indicaciones de peligro detectables al tacto.

ANEXO X

ANEXO X.A

EVALUACION DEL RIESGO: SALUD HUMANA (TOXICIDAD)

PARTE 1

La evaluación del riesgo realizada con arreglo al apartado 2 del artículo 4 tendrá en cuenta, los efectos tóxicos potenciales y las poblaciones que pueden verse expuestas, que se indican a continuación:

Efectos

1. **Toxicidad aguda**
2. **Irritación**
3. **Corrosividad**

4. Sensibilización
5. Toxicidad por dosis repetidas
6. Mutagenicidad
7. Carcinogenicidad
8. Toxicidad para la reproducción

Poblaciones humanas

1. Trabajadores
2. Consumidores
3. Población expuesta indirectamente vía medio ambiente

PARTE 2

1. Identificación de los peligros

a) En aquellos casos en los que los ensayos adecuados para la localización de los elementos de riesgo relacionados con un efecto potencial particular se hayan realizado pero no hayan dado lugar a una clasificación [inciso 1º del apartado 2.b del artículo 4], no será necesario hacer la caracterización del riesgo relacionado con este efecto salvo que haya otros motivos razonables de alarma, por ejemplo, resultados positivos de ensayos in vitro de mutagenicidad.

b) En aquellos casos en los que los ensayos adecuados para la localización de los elementos de riesgo relacionados con un efecto potencial particular no se hayan realizado todavía [inciso 2º del apartado 2.b del artículo 4], no será necesario hacer la caracterización del riesgo relacionado con este efecto salvo que haya otros motivos razonables de alarma, por ejemplo, consideraciones sobre la exposición o indicaciones de toxicidad potencial a partir de la relación entre estructura y actividad.

2. Evaluación de la relación dosis (concentración)-respuesta (efecto)

a) Se evaluará la relación entre dosis y respuesta por lo que respecta a la toxicidad por dosis repetidas y a la toxicidad para la reproducción y, cuando sea posible, se hallará el nivel NOAEL (nivel sin efecto adverso observado). Si no es posible determinar este nivel, se hallará la menor dosis/concentración en la que haya efecto adverso, es decir, el menor LOAEL (nivel más bajo con efecto adverso observado).

b) Por lo que respecta a la toxicidad aguda, corrosividad e irritación, no suele ser posible establecer un NOAEL o un LOAEL basándose en los resultados de los ensayos realizados con arreglo a los requisitos de este Reglamento. Para la toxicidad aguda, se calcularán los valores LD50 o LC50. Cuando se haya usado el procedimiento de dosis fija, se calculará la dosis discriminante. En cuanto a los demás efectos, será suficiente determinar si la sustancia tiene una capacidad inherente de causar esos efectos.

c) En lo que se refiere a la mutagenicidad y carcinogenicidad, bastará con determinar si la sustancia tiene una capacidad inherente de causar esos efectos. No obstante, si puede demostrarse que una sustancia identificada como carcinógeno no es genotóxica, habrá que determinar un NOAEL/LOAEL como se describe en el apartado a).

d) Con respecto a la sensibilización dérmica y respiratoria, al no haber consenso sobre la posibilidad de determinar una dosis/concentración por debajo de la cual es poco probable que haya efectos adversos en un sujeto ya sensibilizado a una sustancia dada, bastará evaluar si la sustancia tiene una capacidad inherente de causar esos efectos.

3. Evaluación de la exposición

a) Se hará una evaluación de la exposición en cada una de las poblaciones humanas (trabajadores, consumidores y población que pueda estar expuesta vía medio ambiente) en las que es razonable suponer que habrá una exposición a la sustancia. El objetivo de la evaluación será el cálculo cuantitativo o cualitativo de la dosis/concentración de la sustancia a la que la población está o va a estar expuesta. Este cálculo tendrá en cuenta las variaciones espaciales y temporales en el modelo de exposición.

b) La evaluación de la exposición se basará en la información del expediente técnico proporcionado de conformidad con la sección 2 del Anexo VII, del presente Reglamento y en cualquier otra información disponible y oportuna. Se tendrá en cuenta en particular, según convenga:

1º Los datos de exposición medidos adecuadamente.
2º La cantidad comercializada de la sustancia.
3º La forma en que se comercializa o utiliza la sustancia (por ejemplo, sustancia sola o como componente de un preparado).
4º Las categorías de uso y grado de confinamiento.
5º Los datos de la elaboración, cuando proceda.
6º Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, incluidas, cuando proceda, las que le confiere la elaboración (por ejemplo, formación de aerosol).
7º Las vías probables de exposición y el potencial de absorción.
8º La frecuencia y duración de la exposición.
9º Tipo y tamaño de la(s) población(es) expuesta(s) cuando tal información esté disponible.

c) Cuando se utilicen modelos predictivos para el cálculo de los niveles de exposición, se dará preferencia a los datos de control relevantes de las sustancias con análogo uso y modelos de exposición.

d) Si una sustancia se encuentra en un preparado, sólo será necesario estudiar la exposición a la sustancia en ese preparado si éste ha sido clasificado basándose en las propiedades toxicológicas de la sustancia con arreglo al Reglamento de Preparados, salvo que haya otros motivos razonables de alarma.

4. Caracterización del riesgo

a) Cuando para alguno de los efectos expresados en la Parte 1 del Anexo X.A se haya encontrado un NOAEL o un LOAEL, la caracterización del riesgo en relación cada uno de esos efectos supondrá la comparación del NOAEL o del LOAEL en el cálculo de la dosis/concentración a la que la población estará expuesta. Si se dispone de una estimación cuantitativa de la exposición, se calculará el cociente nivel de exposición NOAEL/LOAEL. La autoridad competente, basándose en la comparación entre el cálculo cuantitativo o cualitativo de la exposición y el NOAEL (o el LOAEL), decidirá cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) del artículo 4 es de aplicación.

b) Cuando para alguno de los efectos expresados en la parte 1 del Anexo X.A, no se haya determinado un NOAEL (o un LOAEL), la caracterización del riesgo relacionado con cada uno de esos efectos llevará consigo una evaluación, basada en la información cuantitativa o cualitativa sobre la exposición pertinente para las poblaciones humanas consideradas, con probabilidad de que ocurra el efecto. Cuando, a pesar de no haber determinado un NOAEL (o un LOAEL), los ensayos demuestren una relación entre la dosis/concentración y la gravedad de un efecto adverso o cuando, al utilizar un método de ensayo que supone el uso de una sola dosis o concentración, es posible evaluar la gravedad relativa del efecto, se tendrá también en cuenta esa información al evaluar la probabilidad de ocurrencia del efecto. Una vez hecha la evaluación, la autoridad competente decidirá cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) del artículo 4 es de aplicación.

c) Al decidir cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) del artículo 4 es de aplicación, la autoridad competente tendrá en cuenta, entre otras cosas:

1º La incertidumbre que se deriva, entre otros factores, de la variabilidad de los datos experimentales y de la valoración entre especies y dentro de una misma especie.
2º La naturaleza y la gravedad del efecto.
3º La población humana a la que se aplica la información cuantitativa o cualitativa sobre la exposición.

5. Integración

De acuerdo con las disposiciones del apartado 2.a) del artículo 4, puede hacerse una caracterización del riesgo en relación con más de un efecto potencial adverso o una población humana. En esos casos, la autoridad competente juzgará cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) del artículo 4 es de aplicación a cada efecto. Una vez completada la evaluación, la autoridad competente revisará las diversas conclusiones y llegará a conclusiones integradas en relación con la toxicidad global de la sustancia.

ANEXO X.B

EVALUACION DEL RIESGO: SALUD HUMANA (PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS)

PARTE 1

La evaluación del riesgo de acuerdo con el apartado 2 del artículo 4 tendrá en cuenta los efectos adversos potenciales que pueden ocurrir en las siguientes poblaciones humanas que pueden verse expuestas a sustancias con las propiedades siguientes:

Propiedades

1. Explosividad
2. Inflamabilidad
3. Potencial comburente

Poblaciones humanas

1. Trabajadores
2. Consumidores
3. Población expuesta indirectamente vía medio ambiente

PARTE 2

1. Identificación de los peligros

a) En aquellos casos en los que los ensayos adecuados para la identificación de los peligros relacionados con un efecto potencial particular se hayan realizado pero no hayan dado lugar a una clasificación [inciso 1º del apartado 2.b del artículo 4], no será necesario hacer la caracterización del riesgo relacionado con este efecto salvo que haya otros motivos razonables de alarma.

b) En aquellos casos en los que no se hayan realizado todavía los ensayos adecuados para la identificación de los peligros relacionados con un efecto potencial particular [inciso 2º del apartado 2.b) del artículo 4], no será necesario hacer la caracterización del riesgo relacionado con este efecto salvo que haya otros motivos razonables de alarma.

2. Evaluación de la exposición

La evaluación de la exposición se realizara de acuerdo con lo establecido en los puntos 3.a), 3.b) y 3.c) del apartado 2 del Anexo X.A.

Si hay que hacer una caracterización del riesgo de acuerdo con el apartado 2.b) del artículo 4, sólo será necesario determinar las condiciones de uso razonablemente previsibles basándose en la información sobre la sustancia incluida en el expediente técnico, tal como se establece en la sección 2 del Anexo VII de este Reglamento.

3. Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo llevará consigo una evaluación de la probabilidad de que se produzca un efecto adverso en condiciones de uso razonablemente previsibles. Si esta evaluación indica que no se producirá un efecto adverso, se aplicará generalmente la conclusión correspondiente al inciso 1º del apartado 1.d) del artículo 4. Si esta evaluación de la exposición indica que se va a producir un efecto adverso, se aplicará generalmente la conclusión correspondiente al inciso 4º del apartado 1.d) del artículo 4.

4. Integración

Cuando se hayan hecho diferentes recomendaciones para la reducción del riesgo en relación con diferentes efectos sobre poblaciones humanas, se revisarán una vez se haya completado la evaluación del riesgo y la autoridad competente hará recomendaciones integradas.

ANEXO X.C

EVALUACION DEL RIESGO: MEDIO AMBIENTE

1. Identificación de los peligros

a) En el caso de las sustancias no clasificadas como peligrosas para el medio ambiente [inciso 1º del apartado 3.b del artículo 4], la autoridad competente estudiará si hay otros motivos razonables para llevar a cabo una caracterización del riesgo y tendrá en cuenta en particular:

1º Los elementos que indiquen que una sustancia presenta un potencial de bioacumulación.
2º La forma de la curva toxicidad/tiempo en el ensayo de ecotoxicidad.
3º Indicaciones de otros efectos adversos basadas en los estudios de toxicidad, por ejemplo, clasificación como mutagénico, tóxico o muy tóxico o como nocivo con la frase de riesgo R 40 ("posibilidad de efectos irreversibles") o R 48 ("riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada").
4º Datos sobre sustancias de estructura análoga.

b) Si la autoridad competente considera que hay motivos razonables para llevar a cabo una caracterización del riesgo en una sustancia no clasificada como peligrosa para el medio ambiente y para la que se dispone de datos insuficientes sobre efectos en organismos [inciso 2º del apartado 3.b) del artículo 4], tomará las medidas necesarias con arreglo a los incisos 2º ó 3º del apartado 1.d) del artículo 4.

2. Evaluación de la relación dosis (concentración)-respuesta (efecto)

a) El objetivo es predecir la concentración de la sustancia por debajo de la cual no son de esperar efectos adversos en el compartimento ambiental de que se trate. Esta concentración se conoce como concentración prevista sin efecto (PNEC).

b) La PNEC se determinará basándose en la información contenida en el expediente de notificación que se refiere a los efectos en los organismos, tal como determina la sección 5 del Anexo VII de este Reglamento y los estudios de ecotoxicidad recogidos en la lista del Anexo VIII (niveles 1 y 2) de dicho Reglamento.

c) La PNEC se calculará aplicando un factor de evaluación a los valores resultantes de los ensayos en organismos, por ejemplo, LD50 (dosis letal media), LC50 (concentración letal media), EC50 (concentración efectiva media), IC50 (concentración que produce el 50 % de inhibición de un parámetro dado, por ejemplo, crecimiento), NOEL/C (nivel/concentración sin efecto observado) o LOEL/C (nivel/concentración con mínimo efecto observado).

d) Un factor de evaluación es una expresión del grado de incertidumbre en la extrapolación de los datos de un ensayo en un número limitado de especies al medio ambiente real. Por eso, en general, cuanto más amplios sean los datos y mayor la duración de los ensayos, menor será el grado de incertidumbre y la magnitud del factor de evaluación. Normalmente se aplica un factor de evaluación del orden de 1000 a un valor L(E)C50 derivado de los resultados de ensayos de toxicidad aguda, pero este factor puede reducirse si se dispone de otra información pertinente. Se aplica típicamente un factor de evaluación inferior a una NOEC derivada de los resultados de ensayos de toxicidad crónica.

3. Evaluación de la exposición

a) El objetivo de la evaluación de la exposición consistirá en predecir la concentración de la sustancia que se encontrará finalmente en el medio ambiente. Esta concentración se conoce como concentración ambiental prevista (PEC). No obstante, en algunos casos, puede no ser posible establecer una PEC y habrá que hacer una estimación cualitativa de la exposición.

b) Sólo habrá que determinar una PEC o, cuando sea necesario, una estimación cualitativa de la exposición en el caso de aquellos compartimentos ambientales en los que son razonablemente previsibles emisiones, vertidos, eliminaciones o distribuciones.

c) La PEC o la estimación cualitativa de la exposición se calcularán basándose en la información contenida en el expediente técnico tal como determinan los Anexos VII ó VIII de este Reglamento, incluidos, cuando proceda:

1º Los datos de exposición medidos de forma adecuada.
2º La cantidad de sustancia comercializada.
3º La forma de comercialización o uso de la sustancia (sustancia sola o como componente de un preparado).
4º Las categorías de uso y grado de confinamiento.
5º Los datos del proceso, cuando proceda.
6º Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, en particular punto de fusión, punto de ebullición, presión de vapor, tensión superficial, solubilidad en agua, coeficiente de partición n-octanol/agua.
7º Las vías probables de llegada a los compartimentos ambientales y potencial de absorción/desorción y degradación.
8º La frecuencia y duración de la exposición.

d) En el caso de sustancias comercializadas en cantidades de 10 toneladas por año o inferiores (o 50 toneladas acumulativas), la PEC o la estimación cualitativa de la exposición se determinarán generalmente para el medio ambiente local genérico en el que puede darse la liberación de la sustancia.

4. Caracterización del riesgo

a) En cada compartimento ambiental dado, la caracterización del riesgo llevará aparejada, en la medida de lo posible, una comparación de la PEC con la PNEC de la manera que pueda obtenerse una relación PEC/PNEC. Si la relación PEC/PNEC es igual o inferior a la unidad, se aplicarán las conclusiones del inciso 1º del apartado 1.d) del artículo 4. Si la relación es superior a la unidad, la autoridad competente juzgará, basándose en la magnitud de la relación, y en otros factores pertinentes, como los que se enumeran en los incisos 1º a 4º del punto a) de este Anexo, cuál de las conclusiones de los incisos 2º, 3º ó 4º del apartado 1.d) del artículo 4 es adecuada.

b) Si no ha sido posible derivar relaciones PEC/PNEC, la caracterización del riesgo llevará aparejada una evaluación cualitativa de la probabilidad de que ocurra un efecto en las condiciones previstas de exposición. Una vez hecha esta evaluación, y habiendo tenido en cuenta factores pertinentes como los enumerados en el punto a) de este Anexo, la autoridad competente decidirá cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) del artículo 4 es adecuada.

5. Integración

De acuerdo con las disposiciones del apartado 3.a), puede hacerse una caracterización del riesgo en relación con más de un compartimento ambiental. En esos casos, la autoridad competente juzgará cuál de las cuatro conclusiones del apartado 1.d) es de aplicación a cada compartimento. Una vez completada la evaluación del riesgo, la autoridad competente revisará las diversas conclusiones y llegará a conclusiones integradas en relación con los efectos ambientales globales de la sustancia.

ANEXO X.D

INTEGRACION GLOBAL DE LAS CONCLUSIONES

1. Las conclusiones a las que se haya llegado con arreglo al apartado 5 del Anexo X.A, el apartado 5 del Anexo X.B y el apartado 5 del Anexo X.C serán revisadas por la autoridad competente e integradas en relación con la totalidad de los elementos de peligro localizados en la evaluación del riesgo.

2. Si se requiere más información [incisos 2ª y 3ª del apartado 1.d)] o se recomienda reducir el riesgo [inciso 4ª del apartado 1.d)], se justificará debidamente. La recomendación de reducción del riesgo tendrá en cuenta el apartado 1.6).

ANEXO X.E

INFORMACION QUE SE INCLUIRA EN EL RESUMEN DE EVALUACION DEL RIESGO

1. El informe escrito presentado a la Comisión con arreglo al artículo 4, apartado 4.c), incluirá los elementos siguientes:

   a) Un resumen general de las conclusiones a las que se haya llegado con arreglo al artículo 4.a) y b) y de conformidad con el Anexo X.D.

   b) Si la conclusión del inciso 1ª del apartado 1.d) del artículo 4 se aplica a la sustancia en relación con todos los efectos potenciales adversos, las poblaciones humanas y los compartimentos ambientales, una declaración de que, según la información disponible, la sustancia no es motivo de preocupación inmediata y de que no es necesario un estudio ulterior hasta que el notificante haya presentado información adicional con arreglo al apartado 2 del artículo 7, el apartado 4 del artículo 8 o el apartado 1 del artículo 14 del presente Reglamento.

   c) Si la conclusión de los incisos 2ª ó 3ª del apartado 1.d) del artículo 4 se aplica a uno o más efectos adversos potenciales, poblaciones humanas o compartimentos ambientales, una descripción y justificación de la información adicional exigida.

   d) Si la conclusión del inciso 4ª del apartado 1.d) del artículo 4 se aplica a uno o más efectos adversos potenciales, poblaciones humanas o compartimentos ambientales, una descripción y justificación de las recomendaciones de reducción del riesgo.

   e) Si se han tomado medidas tal como dispone el apartado 1.e) del artículo 4, un resumen de los comentarios del notificante sobre las propuestas de la autoridad competente y de cualquier información pertinente adicional de que se disponga.

2. Cuando la caracterización del riesgo lleve aparejada el uso de relaciones exposición/efecto tal como se describen en la sección 4 de la parte 2 del Anexo X.A y la sección 4 del Anexo X.C, o el uso de factores de evaluación tal como se describen en la sección 2 del Anexo X.C, esas relaciones o factores deberán indicarse.

A N E X O XI.

GUIA PARA LA ELABORACION DE FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD.

Las notas explicativas que siguen son orientativas. Su objetivo es asegurar que el contenido de cada uno de los epígrafes obligatorios enumerados en el artículo 23, permita a los usuarios profesionales tomar las medidas necesarias con respecto a la protección de la salud y de la seguridad en el lugar de trabajo y a la protección del medio ambiente.

Las informaciones se han de redactar de forma clara y concisa.

En algunos casos, debido a la amplia gama de propiedades de las sustancias y preparados, puede resultar necesaria una información complementaria. Si, en otros casos, la información derivada de algunas propiedades no fuera pertinente e incluso fuera técnicamente imposible proporcionarla, se deberán especificar claramente las razones.

Aunque el orden de los epígrafes no es obligatorio, se recomienda seguir la ordenación facilitada en el artículo 23.

En caso de que se revise una ficha de datos de seguridad, los cambios se deberán comunicar al destinatario.

1. Identificación de la sustancia o del preparado y de la sociedad o empresa.

   a) Identificación de la sustancia o del preparado:

      La denominación empleada para su identificación deberá ser idéntica a la que figura en la etiqueta, tal como se define en el anexo VI de este Reglamento.

      Se podrán indicar otros medios de identificación en caso de que existan.

   b) Identificación de la sociedad o empresa:

      1ª Identificación del responsable de la puesta en el mercado establecido en la Comunidad, ya sea el fabricante, el importador o el distribuidor.

      2ª Dirección completa y número de teléfono de este responsable.

   c) A fin de completar la información anteriormente mencionada, facilítese el número de teléfono de urgencias de la empresa y/o del organismo oficial responsable, tal como se define en el artículo 12 del Reglamento de preparados peligrosos.

2. Composición/información sobre los componentes.

   Estas informaciones deben permitir al destinatario conocer sin dificultad los riesgos que pueda presentar la sustancia o el preparado.

   Por lo que respecta a los preparados:

   a) No es necesario indicar su composición completa (naturaleza de los componentes y su concentración).

   b) Sin embargo, es preciso mencionar la concentración o gama de concentración en caso de que se presenten con concentraciones iguales o superiores a las dispuestas en el punto a) del apartado 3.6 del artículo 3 del Reglamento de Preparados Peligrosos, excepto si un límite inferior fuera más apropiado:

      1ª las sustancias peligrosas para la salud, tal y como se definen en el presente Reglamento y,

      2ª al menos las sustancias con respecto a las cuales tengan, en virtud de estas disposiciones, límites de exposición reconocidos pero que no estén incluidos en el anexo I del presente Reglamento.

   c) Para las sustancias mencionadas anteriormente, hay que indicar su clasificación, ya sea la derivada del artículo 5 ó la del anexo I de este Reglamento, es decir, los símbolos y frases R que se les hayan asignado, peligrosas para la salud.

   d) Si, de conformidad con el apartado 1 del artículo 7 del Reglamento de Preparados Peligrosos, la identidad de algunas sustancias tuviera que mantenerse confidencial, habrá que describir su naturaleza química para garantizar la seguridad de empleo. El nombre a utilizar deberá ser el mismo que el que derive de la aplicación del contenido del apartado antes mencionado.

3. Identificación de peligros.

   Indicar clara y brevemente los peligros principales, especialmente los peligros esenciales que presenta la sustancia o el preparado para el hombre o el medio ambiente.

   Describir los principales efectos peligrosos para la salud del hombre y los síntomas relacionados con la utilización y el uso incorrecto razonablemente previsible.

   Estas informaciones deberán ser compatibles con las que figuren en la etiqueta, pero, sin embargo, no deberán repetirse.

4. Primeros auxilios.

   Describir los primeros auxilios a emplear. No obstante, es importante especificar si se precisa un examen médico inmediato.

   La información sobre primeros auxilios debe ser breve y fácil de entender por el accidentado, los allí presentes y los socorristas.

   Deberán describirse brevemente los síntomas y los efectos y se indicará en las instrucciones lo que se ha de hacer sobre el terreno en caso de accidente y si son previsibles efectos retardados tras una exposición.

   Prever un apartado según las distintas vías de exposición, es decir, inhalación, contacto con la piel y con los ojos e ingestión.

   Indicar si se requiere o es aconsejable atención médica.

   Puede resultar importante, en el caso de algunas sustancias o preparados, hacer hincapié en la necesidad de disponer de medios especiales para aplicar un tratamiento específico e inmediato en el lugar de trabajo.

5. Medidas de lucha contra incendios.

   Indicar las normas de lucha contra un incendio provocado por la sustancia o el preparado u originado en sus proximidades haciendo referencia a:

   a) Los medios de extinción adecuados:
   b) Los medios de extinción que no deben utilizarse por razones de seguridad;

c) Los riesgos especiales particulares que resulten de la exposición a la sustancia o al preparado en sí, a los productos de combustión o gases producidos;

d) El equipo de protección especial para el personal de lucha contra incendios.

6. Medidas a tomar en caso de vertido accidental.

Según cuál sea la sustancia o el preparado de que se trate, eventualmente se necesitará información sobre:

a) Precauciones individuales: alejarse de las fuentes de inflamación, suficiente ventilación/protección respiratoria, lucha contra el polvo, prevención de contacto con la piel y los ojos.

b) Precauciones para la protección del medio ambiente: evitar la contaminación de desagües, aguas superficiales y subterráneas así como del suelo: eventual alerta al vecindario.

c) Métodos de limpieza: Utilización de materiales absorbentes (por ejemplo: arena,tierra de diatomeas, aglomerante ácido, aglomerante universal, serrín, etc.), eliminación por proyección de agua de los gases/humos, dilución.

Se considerará también la necesidad de dar indicaciones del tipo: no utilice nunca....., neutralice con....

Nota: Si se considera oportuno, hacer referencia a los puntos 8 y 13.

7. Manipulación y Almacenamiento.

a) Manipulación.

Considerar las precauciones a tomar para garantizar una manipulación sin peligro que incluya medidas de orden técnico tales como la ventilación local y general, las medidas destinadas a impedir la formación de partículas en suspensión y polvo, o para prevenir incendios, así como cualquier otra exigencia o norma específica relativa a la sustancia o al preparado (por ejemplo, equipo y procedimiento de empleo recomendado o prohibidos), proporcionando si es preciso una breve descripción.

b) Almacenamiento.

Estudiar las condiciones necesarias para un almacenamiento seguro como, por ejemplo: diseño especial de locales o depósitos de almacenamiento (incluidas paredes de protección y ventilación), materiales incompatibles, condiciones de almacenamiento (temperatura y límite/intervalo de humedad, luz, gases inertes, etc.), equipo eléctrico especial y prevención de la acumulación de la electricidad estática. Llegado el caso, indicar las cantidades límites que pueden almacenarse. Indicar, en concreto, cualquier dato específico como, por ejemplo, el tipo de material utilizado en el envase contenedor de la sustancia o del preparado.

8. Controles de exposición/protección personal.

En el presente documento, la noción de control de exposición cubre todas las precauciones a tomar durante la utilización para reducir al mínimo la exposición de los trabajadores.

Se deben adoptar medidas de orden técnico antes de recurrir a los equipos de protección personal. Por tanto, conviene suministrar informaciones sobre la concepción del sistema, por ejemplo, recinto de confinamiento. Esta información será complementaria de la proporcionada en el punto 7.1.

Indicar todo parámetro específico de control con su referencia, como valores límite o normas biológicas. Proveer información sobre los procedimientos de vigilancia recomendados e indicar la referencia.

En los casos en los que la protección personal sea necesaria, especificar el tipo de equipo que proporcione una protección adecuada:

a) Protección respiratoria:

Si se trata de gases, vapores o polvos peligrosos se tendrá en cuenta la necesidad del equipo de protección apropiado, como aparatos respiratorios autónomos, máscaras y filtros adecuados.

b) Protección de las manos:

Especificar el tipo de guantes que deben usarse para la manipulación de la sustancia o del preparado. Si es necesario, indicar cualquier medida complementaria de protección de las manos y de la piel.

c) Protección de los ojos:

Especificar el tipo de protección ocular que se necesita: gafas de seguridad, gafas protectoras, escudo facial.

d) Protección cutánea:

Si se trata de proteger una parte del cuerpo distinta de las manos, especificar el tipo de equipo de protección que se necesita: mono, delantal, botas.

Si es preciso, indicar todas las medidas de higiene particulares.

9. Propiedades físicas y químicas.

Este epígrafe debe contener las informaciones siguientes, según se aplique a la sustancia o al preparado:

a) Aspecto: Indicar el estado físico (sólido, líquido, gas) y el color de la sustancia o del preparado tal y como se comercialice.

b) Olor: Si el olor es perceptible, describirlo brevemente.

c) pH: Indicar el pH de la sustancia o del preparado tal como se comercialice o de una solución acuosa; en este último caso, indicar la concentración.

Punto/intervalo de ebullición: Punto/intervalo de fusión: Punto de destello: Inflamabilidad (sólido, gas): Autoinflamabilidad: Peligro de explosión: Propiedades comburentes: Presión de vapor: Densidad relativa: Solubilidad - Hidrosolubilidad - Liposolubilidad Disolvente-aceite: a precisar) Coeficiente de reparto: n - octanol/agua	con arreglo al Presente Reglamento

d) Otros datos: Indicar los parámetros importantes para la seguridad, tales como densidad de vapor, la miscibilidad, la velocidad de evaporación, la conductividad, la viscosidad, etc.

Estas propiedades se determinarán siguiendo las disposiciones de la parta A del anexo V del presente Reglamento o por cualquier otro método equivalente.

10. Estabilidad y reactividad.

Indicar la estabilidad de la sustancia o del preparado y la posibilidad de reacciones peligrosas, bajo ciertas condiciones.

Condiciones a evitar:

Enumerar las condiciones tales como la temperatura, la presión, la luz, los choques..., susceptibles de provocar una reacción peligrosa y, si es posible, describirlas brevemente.

Materias a evitar:

Enumerar las materias tales como el agua, el aire, los ácidos, las bases, los oxidantes, o cualquier otra sustancia específica susceptible de provocar una reacción peligrosa y, si es posible, describirlas brevemente.

Productos de descomposición peligrosos:

Enumerar las materias peligrosas producidas en cantidades peligrosas como resultado de la descomposición.

Nota: Señalar expresamente:

a) La necesidad y la presencia de estabilizadores.

b) La posibilidad de una reacción exotérmica peligrosa.

c) Las posibles repercusiones que un cambio del aspecto físico de la sustancia o del preparado pueda tener en la seguridad.

d) Los productos de descomposición peligrosos que eventualmente se puedan formar como resultado del contacto con el agua.

e) La posibilidad de degradación en productos inestables.

11. Información toxicológica.

Este epígrafe responde a la necesidad de dar una descripción concisa, aunque completa y comprensible, de los diferentes efectos tóxicos que se pueden observar cuando el usuario entra en contacto con la sustancia o el preparado.

Se incluirán, cuando proceda, los efectos peligrosos para la salud debidos a una exposición a la sustancia o al preparado, tanto si estos efectos están basados en casos reales como en conclusiones de experimentos científicos. Se incluirá información sobre las diferentes vías de exposición (inhalación, ingestión, contacto con la piel y los ojos), y se describirán los síntomas relacionados con las propiedades físicas, químicas y toxicológicas. Indicar los efectos retardados e inmediatos conocidos, así como los efectos crónicos producidos por una exposición a corto y

largo plazo: por ejemplo, sensibilización, efectos carcinogénicos, mutagénicos, la toxicidad para la reproducción, incluidos los efectos teratogénicos y la narcosis.

Teniendo en cuenta la información ya facilitada en el epígrafe 2, "Composición/información sobre los componentes", puede resultar necesario hacer referencia a los efectos específicos que pueden tener para la salud determinados componentes presentes en los preparados.

12. Informaciones ecológicas.

Determinar los efectos, comportamiento y destino final debidos a la naturaleza de la sustancia o el preparado y sus usos previsibles. Se facilitará información del mismo tipo acerca de los productos peligrosos resultantes de la degradación de sustancias y preparados.

Ejemplos de información ecológica pertinentes:

Movilidad:
- Distribución conocida o prevista en los diferentes departamentos ambientales.
- tensión superficial.
- adsorción/desorción.
- otras propiedades físico-químicas, véase la sección 9.

Degradabilidad
- degradación biótica y abiótica
- degradación aerobia y anaerobia
- persistencia.

Acumulación
- potencial de bioacumulación
- bioamplificación

Ecotoxicidad Efectos a corto y largo plazo en:
- organismos acuáticos.
- organismos del suelo.
- plantas y animales terrestres

Otros efectos adversos:
- potencial de agotamiento del ozono
- potencial de formación de ozono fotoquímico
- potencial de recalentamiento del planeta
- efectos en las centrales de tratamiento de aguas residuales

Observaciones:

Se deberá facilitar información ambiental pertinente en otras secciones de la ficha de datos de seguridad, en particular, asesorameinto sobre el vertido controlado, medidas en caso de vertido accidental y consideraciones sobre la eliminación en las secciones 6, 7, 13 y 15.

Mientras se estén elaborando los criterios definitivos de evaluación de las incidencias de un preparado en el medio ambiente, las informaciones relativas a las propiedades anteriormente mencionadas serán facilitadas con respecto a las sustancias presentes en el preparado y clasificadas como peligrosas para el medio ambiente.

13. Consideraciones sobre la eliminación

Si la eliminación de la sustancia o del preparado (excedentes o residuos resultantes de su utilización previsible) presenta un peligro, conviene facilitar una descripción de estos residuos así como información sobre la manera de manipularlos sin peligro.

Indicar los métodos apropiados de eliminación tanto de la sustancia o del preparado así como de los envases contaminados (incineración, reciclado, vertido controlado, etc.).

NOTA.

Mencionar toda disposición nacional relacionada con la eliminación de residuos. Si éstas no existieran, sería conveniente recordar al usuario que puede haber en vigor otras disposiciones de carácter autonómico o local.

14. Información relativa al transporte

Indicar todas las precauciones especiales que el utilizador deba conocer o tomar para el transporte dentro y fuera de sus instalaciones.

A modo de información complementaria, se podrán facilitar datos relativos al transporte y envasado de mercancías peligrosas de conformidad con la Recomendación de las Naciones Unidas y otros acuerdos internacionales.

15. Información reglamentaria

Dar las informaciones que figuran en la etiqueta con arreglo a las disposiciones relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias y de los preparados peligrosos.

Si la sustancia o el preparado al que se refiere la ficha de seguridad ha sido objeto de disposiciones particulares en materia de protección del hombre y el medio ambiente (por ejemplo limitación de empleo, limitación de comercialización puesta en el mercado, valores límites de exposición en el lugar de trabajo), éstas deberán citarse en la medida de lo posible.

Es también deseable que la ficha de datos de seguridad recuerde a los destinatarios que deben cumplir cualquier otra disposición nacional de aplicación.

16. Otras informaciones

Indicar toda información que pueda ser importante para la seguridad y la salud, así como para la protección del medio ambiente, por ejemplo:

- consejos relativos a la formación;
- usos recomendados y restricciones;
- otras informaciones (referencias escritas y/o punto de contacto técnico);
- fuentes de los principales datos utilizados en la ficha.

Se deberá facilitar asimismo la fecha de emisión de la ficha de datos de seguridad, si ésta no se especifica en ninguna parte.