384L0449

19. 9. 84 Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° L 251/1

DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 25 de abril de 1984

por la que se adapta, por sexta vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas

(84/449/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 67/548/CEE del Consejo, de 27 de junio de 1967, relativa la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (1), modificada por sexta vez por la Directiva 79/831/CEE del Consejo (2), en particular, sus artículos 19, 20 y 21,

Considerando que el apartado 1 del artículo 3 de la Directiva 79/831/CEE dispone que la determinación de las propiedades fisicoquímicas toxicidad y ecotoxicidad de las sustancias y preparados se realice de acuerdo con los métodos previstos en el Anexo V;

Considerando que el artículo 19 de la Directiva 79/831/CEE, de 18 de septiembre de 1979, dispone que el Anexo V esté sometido al procedimiento del Comité de adaptación al progreso técnico; considerando que, más especialmente, es preciso tener en cuenta los métodos reconocidos y recomendados por los organismos internacionales competentes;

Considerando que las disposiciones de la presente Directiva concuerdan con el dictamen del Comité para la adaptación al progreso técnico de las directivas dirigidas a la eliminación de los obstáculos técnicos a los intercambios en el sector de las sustancias y preparados peligrosos,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El texto del Anexo V de la Directiva 67/548/CEE será sustituido por el texto que figura como Anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros adoptarán y publicarán, antes del 1 de julio de 1985, las disposiciones necesarias para cumplir la presente Directiva e informarán de ello inmediatamente a la Comisión. Dichas disposiciones serán aplicables a partir del 1 de julio de 1986.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 25 de abril de 1984.

Por la Comisión

Karl-Heinz NARJES

Miembro de la Comisión

(1) DO nº L 196 de 16. 8. 1967, p. 1.
(2) DO nº L 259 de 15. 10. 1979, p. 10.

ANEXO

El presente Anexo describe los métodos de ensayo para la determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas enumeradas en los Anexos VII y VIII de la Directiva 79/831/CEE.

Dichos métodos se basan en los trabajos y recomendaciones de los organismos internacionales competentes [en particular la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE)].

Cuando se ha podido disponer de tales métodos, se han adoptado las normas nacionales o aquellos métodos ampliamente reconocidos por los medios científicos. En general, las pruebas deberán hacerse con la sustancia tal y como ésta se comercializa. No debe subestimarse la posible incidencia de las impurezas en los resultados de los ensayos.

Cuando los métodos del presente Anexo no se adapten al análisis de una propiedad determinada, el notificante deberá justificar los métodos que haya empleado en su lugar.

Las experimentaciones y los estudios en animales deberán atenerse las regulaciones 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 elegirá aquel que precise el menor número de animales.

ÍNDICE

		Pág.
PARTE A: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS		6
A. 1.	Punto de fusión/intervalo de fusión	6
A. 2.	Punto de ebullición/intervalo de ebullición	15
A. 3.	Densidad relativa	22
A. 4.	Presión de vapor	27
A. 5.	Tensión superficial	39
A. 6.	Hidrosolubilidad	46
A. 7.	Liposolubilidad	55
A. 8.	Coeficiente de reparto	59
A. 9.	Punto de inflamación	63
A. 10.	Inflamabilidad (sólidos)	65
A. 11.	Inflamabilidad (gases)	68
A. 12.	Inflamabilidad (sustancias y preparados que, en contacto con el agua o con el aire húmedo, desarrollan gases fácilmente inflamables en cantidades peligrosas)	70
A. 13.	Inflamabilidad (sólidos y líquidos)	74
A. 14.	Propiedades explosivas	76
A. 15.	Autoinflamabilidad (determinación de la temperatura de autoinflamabilidad de los líquidos volátiles y de los gases)	86
A. 16.	Autoinflamabilidad (sólidos - determinación de la temperatura relativa de inflamación espontánea)	88
A. 17.	Propiedades comburentes	91
PARTE B: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD		96
Introducción general		96
B. 1.	Toxicidad aguda — administración oral	98
B. 2.	Toxicidad aguda — administración por inalación	101
B. 3.	Toxicidad aguda — administración cutánea	105
B. 4.	Toxicidad aguda — irritación de piel	108
B. 5.	Toxicidad aguda — irritación de los ojos	111
B. 6.	Toxicidad aguda — sensibilización de la piel	115
B. 7.	Toxicidad subaguda — administración oral	121
B. 8.	Toxicidad subaguda — administración por inalación	124
B. 9.	Toxicidad subaguda — administración cutánea	129
B. 10.	Otros efectos: mutagénesis — prueba citogenética *in vitro* en mamífero	133
B. 11.	Otros efectos: mutagénesis — prueba citogenética *in vivo* en médula ósea de mamífero, análisis cromosómica	136
B. 12.	Otros efectos: mutagénesis — prueba del micronúcleo	139
B. 13.	Otros efectos: mutagénesis — prueba de mutación revertida en *Escherichia coli*	142
B. 14.	Otros efectos: mutagénesis — prueba de mutación revertida en *Salmonella thyphimurium*	145
PARTE C: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD		148
C. 1.	Toxicidad aguda para los peces	148
C. 2.	Toxicidad aguda para las *Daphnia*	157
C. 3.	Degradación biótica: prueba «screening» OCDE modificada	162
C. 4.	Degradación biótica: prueba AFNOR NF T 90/302 modificada	172
C. 5.	Degradación biótica: prueba Sturm modificada	181
C. 6.	Degradación biótica: prueba en frasco cerrado	190
C. 7.	Degradación biótica: prueba MITI modificada	201
C. 8.	Degradación: demanda bioquímica de oxígeno	214
C. 9.	Degradación: demanda química de oxígeno	216
C. 10.	Degradación abiótica: Hidrólisis en función del pH	218

PARTE A: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

A.1. PUNTO DE FUSIÓN/INTERVALO DE FUSIÓN

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1).

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 que se deba ensayar.

Por consiguiente, el factor restrictivo estará directamente relacionado con el hecho 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 las líneas directrices.

1.2 Definición y unidades

El punto de fusión se define como la temperatura a la que se produce la transición de la fase sólida a la fase líquida, a presión atomosférica normal.

Idealmente, dicha temperatura corresponde a la del punto de solidificación o 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 interval de fusión.

Conversión de las unidades (K en °C).

$t = T - 273{,}15$

donde t se expresa en grados centigrados y T en grasos Kelvin.

1.3. Sustancias de referencia

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deberán servir, esencialmente, para calibrar el método de vez en cuando y para comparar los resultados cuando se aplique otro método distinto.

En las referencias (2) se enumeran determinadas sustancias patrón.

1.4. Principio del método de ensayo

Se determina la temperatura (o intervalo de temperatura) de transición de la fase sólida a la fase líquida. En la práctica, las temperaturas de comienzo y fin de la fusión se determinan durante el calentamiento, a presión atmosférica, de la sustancia que se deba ensayar. Se describen tres tipos de métodos: el método del tubo capilar, el método del banco de calor y la determinación del punto de congelación.

1.4.1. *Método de tubo capilar*

1.4.1.1. Dispositivo con un baño líquido

Introducir una pequeña cantidad de sustancia finamente pulverizada en un tubo capilar y comprimirla con cuidado. Calentar dicho tubo al mismo tiempo que un termómetro y ajustar el aumento de temperatura, a poco más de 1 K por minuto, durante la operación. Tomar nota de las temperaturas correspondientes al comienzo y final de la fusión.

1.4.1.2. Dispositivo con un 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 la 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 el recinto de calor. Este método no es aplicable a determinadas sustancias muy coloreadas.

1.4.2. *Métodos con superdicie calentada*

1.4.2.1. Método del banco de calor Kofler

El banco de calor de Kofler se compone de dos piezas de metal de conductividad térmica diferente, que se calientan eléctricamente. Está hecho de manera que el gradiente de temperatura sea casi lineal en todo su longitud. La temperatura de dicho banco puede variar de 283 a 543 K gracias a un dispositivo de lectura de la temperatura que tiene un cursor con un indice y una regleta graduada, especialmente concebido para dicho banco. Para determinar un punto de fusión basta con depositar una fina capa de sustancia directamente sobre la superfície del banco. 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 también con 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 pantalla se cierra con una placa de vidrio para impedir la circulación de aire en el campo de trabajo. El calentamiento de la muestra se regula con un reostato.

Para realizar mediciones muy precisas se puede utilizar luz polarizada en el análisis de la sustancias ópticamente anisótropas.

1.4.2.3. Método de menisco

Este método se aplica especialmente a la poliamidas.

Determinación de la temperatura a la cual se observa, a simple vista, el desplazamiento de un menisco de aceite de silicona, atrapado entre una superfície caliente y un cubreobjetos colocado encima de la muestra de poliamida que se deba ensayar.

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 cristalización.

Agitar suavemente la muestra durante el tiempo de enfriamiento, observando, al mismo tiempo la temperatura y registrándola cada treinta segundos.

Cuando varias lecturas indiquen una temperatura constante, se considera el valor de esta última como el punto de cristalización (previa corrección termométrica).

1.5. **Criterios de cualitativos**

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. Métodos de tubo capilar

Método de medida	Sustancias fácilmente pulverizables	Sustancias dificilmente pulverizables	Gama de temperatura	Precisión máxima aproximada (1)	Observación
Dispositivo con un baño de líquido	Sí	Sólo algunas	De 273 a 573 K	± 0,3 K	Norma existente: JIS K 064
Dispositivo con un bloque metálico	Sí	Sólo algunas	De 293 a 573 K	± 0,5 K	Norma existente: ISO 1218(E)
Detección fotoeléctrica	Sí	Varias condispostivos de aplicación	De 253 a 573 K	± 0,1 K	

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

B. Métodos de superfície caliente y de punto de congelación

Método de medida	Sustancias fácilmente pulverizables	Sustancias dificilmente pulverizables	Gama de temperatura	Precisión máxima aproximada (1)	Observación
Placa caliente Kofler	Sí	No	De 283 a 543 K	± 1,0 K	Norma existente ANSI/ASTM D 3451-76
Microscopio de fusión	Sí	Sólo algunas	De 273 a 573 K (hasta 1 773 K)	± 0,2 K	Norma existence DIN 53736
Método del menisco	No	Específico de las poliamidas	De 293 a 573 K	± 0,5 K	Norma existente ISO 1218 (E)
Método del punto de congelación	Para las sustancias líquidas	Para las sustancias líquidas	De 223 a 573 K	± 0,5 K	Norma existente por ejemplo BS 4699

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

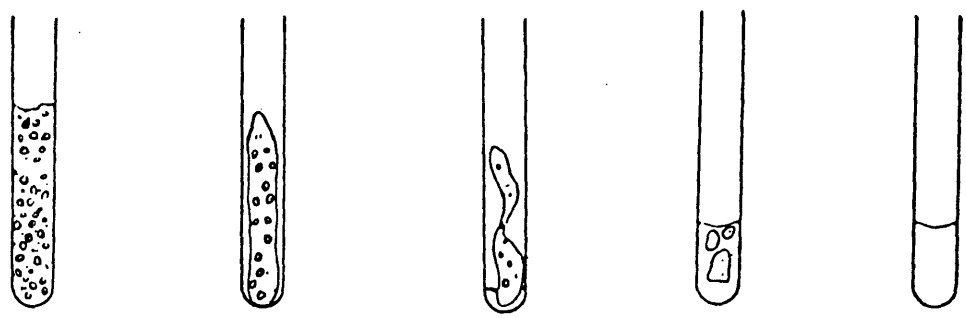
1.6 **Descripción de los métodos**

Los procedimientos de casi todos los métodos de ensayo están descritos en normas internacionales y nacionales (ver Apéndice).

1.6.1. *Método 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; punto húmedo): se adhieren uniformemente gotas finas a la pared interior del tubo capilar.

Fase B (punto de retirada): aparece un espacio libre entre la muestra y la pared interior, en razón de la retracción del producto en fusión.

Fase C (punto de hundimiento): la muestra, retraída, comienza a hundirse y a licuarse.

Fase D (punto de licuefacción): se forma un menisco completo en la superficie, pero queda todavía cierta cantidad de partículas sólidas.

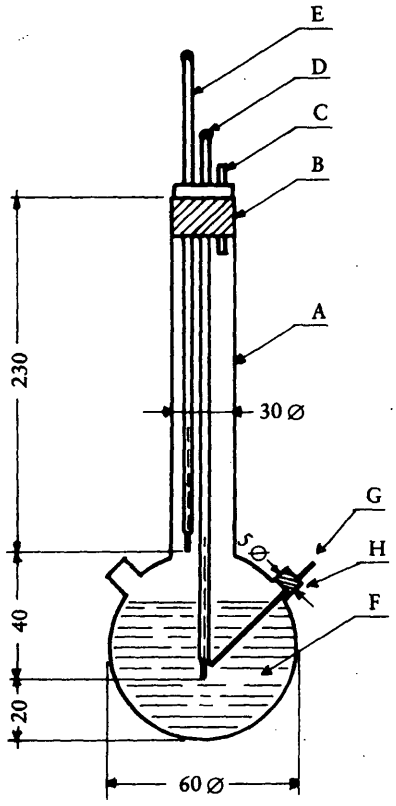
Fase E (fin de la fusión): no hay ya ninguna partícula sólida.

Durante la determinación del punto de fusión, conviene aumentar la temperatura al comienzo y al final de la fusión.

1.6.1.1. Dispositivos con un baño de líquido

La figura 2 representa un tipo de aparato estandarizado (JIS K 0064). Todas las dimensiones estan expresadas en milímetros. El aparato es de vidrio.

Figura 2



A: Matraz de medida
B: Tapón de corcho
C: Tubo de ventilación
D: Termómetro
E: Termómetro auxiliar
F: Baño líquido
G: Tubo capilar de vidrio (80 a 100 mm de longitud; 1 mm ± 0,2 mm de diámetro interior y 0,2 a 0,3 mm de espesor)
H: Tubo lateral

Baño líquido

El líquido deberá elegirse en función del punto de fusión. Se utilizará parafina líquida para los puntos de fusíon que pasen de 473 K ácido sulfúrico concentrado o aceite de silicona para los puntos de fusión que no pasen de 573 K.

Padrá 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.

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 de llenado se fijará en unos 3 milímetros después de haberla comprimido ligeramente. Para obtener una muestra uniformemente comprimida, hay que dejar caer el tubo capilar desde una altura de unos 700 milímetros en 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 recipiente de mercurio del termómetro esté en contacto con la parte del capilar que contiene la muestra. En general, el tubo capilar no se introduce en el aparato hasta 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 llegue a 3 K por minuto. Agitar el líquido. Al llegar a unos 10 k por debajo de la temperatura esperada, regular el aumento de temperatura a un máximo de 1 K por 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.

1.6.1.2. Bloque metálico

Aparato

El aparato constará 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, perpendicularmente opuéstas, 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 bombillàs,

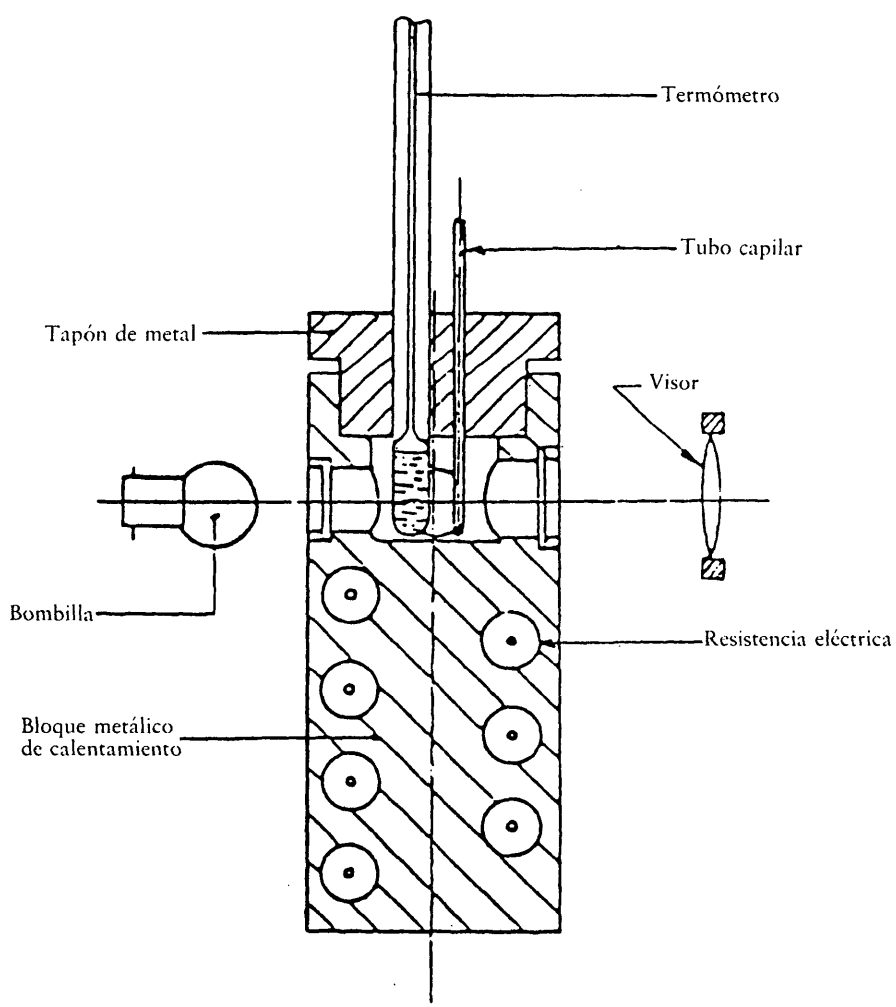
— un tubo capilar, de vidrio resistente al calor, cerrado en un extremo (ver punto 1.6.1.1).

Termómetro:

Ver normas 1.6.1.1.

También podrán utilizarse elementos termoeléctricos de una precisión equivalente.

Figura 3



Procedimiento

Ver punto 1.6.1.1. La corrección del termómetro no es necesaria en este caso. La temperatura de fusión registrada se considera como el punto de fusión.

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 punto 1.6.1.1 y se colocan en el horno.

Se pueden hacer cinco aumentos lineales de temperatura para calibrar el aparato. El aumento de temperatura apropiado se regula eléctricamente con un factor constante y lineal preseleccionado. Los aparatos registradores indican la temperatura real del horno y el punto de fusión de la sustancia en los tubos capilares.

1.6.2. *Métodos de la superficie calentada*

1.6.2.1. Banco de calor Kofler

Ver Apéndice.

1.6.2.2. Microscopio de fusión

Ver Apéndice.

1.6.2.3. Método del menisco (poliamidas)

Ver Apéndice

Cuando el punto de fusión esté próximo, el aumento de temperatura deberá ser inferior a 1 K/min.

1.6.3. *Métodos de determinación del punto de congelación*

Ver Apéndice.

2. **RESULTADOS**

En determinados casos es necesaria la corrección del termómetro.

3. **INFORME**

Debe indicarse el método utilizado.

El punto de fusión indicado en el informe será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas dentro de los límites de precisión aproximativa (ver cuadro). Debe indicarse una estimación de la precisión. 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.

Determinadas sustancias pueden descomponerse o sublimarse antes de alcanzar el punto de fusión. En tal caso, conviene señalarlo.

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. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 102 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 48, 1976, pp. 505-515.

Apéndice

Para más detalles técnicos, se pueden consultar, por ejemplo, las normas siguientes:

1. **Métodos de tubo capilar**

1.1. *Dispositivo con un 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. *Dispositivo con un 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. *Banco de calor Kofler*

ANS1/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 »
ANST/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 10319	Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch

DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen. Onokraftstoffen und Motorenbezolen
DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunktes am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fertsäuren
NP T 60-114	Point de fusion des paraffines

A.2. PUNTO DE EBULLICIÓN/INTERVALO DE EBULLICIÓN

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. Introducción

Los métodos y dispositivos aquí descritos pueden aplicarse a las sustancias líquidas que no sufran reacción química por debajo del punto de ebullición (por ejemplo autooxidación, degradación, etc.). Los métodos son aplicables a las sustancias líquidas puras e impuras.

La importancia dada a la descripción del método basado en la detección fotoeléctrica se debe al hecho de que ésta permite determinar no sólo el punto de ebullición sino también el punto de fusión. Además, las medidas pue den efectuarse de manera automática.

El «método dinámico» tiene la ventaja de poder utilizarse igualmente para la determinación de la présión 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 mantener la presión normal. Este método no se ha automatizado todavía.

Observaciones

La influencia de las impurezas en la determinación del punto de ebullición depende mucho de la naturaleza de la impureza. Dicha influencia será considerable si la muestra contiene un disolvente muy volátil.

La composición de la muestra estudiada varía en cada medición en razón de la volatilización de los componentes con punto de ebullición bajo. En dichas condiciones, se obtienen valores cada vez más fuertes.

1.2. Definiciones y unidades

La temperatura de ebullición normal se define como la temperatura en que la presión de vapor saturada de un líquido es igual a la presión normal.

El valor medido del punto de ebullición depende de la presión atmosférica. Dicha dependencia puede calcularse cuantitativamente por la ecuación de Clapeyron-Clausius siguiente:

$$\log p = - \frac{\Delta H_v}{2{,}3\,RT} + \text{constante}$$

donde

p = presión de vapor de la sustancia en Pascal

ΔH_v = calor de vaporización en J mol^{-1}

R = constante de gases universal = 8,31 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura, expresada en K.

La temperatura en el punto de ebullición (temperatura de ebullición) es la correspondiente 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 utilización del «bar» pero no es recomendable).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (no se permite la utilización del «Torr» ni «mm Hg»).

Temperatura (unidad: K)

$t = T - 273{,}15$

(t en °C y T en K).

1.3. **Sustancias de referencia**

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven, esencialmente para calibrar el método de vez en cuando y para poder comparar los resultados.

En los métodos enumerados en el Apéndice figuran algunas sustancias de referencia.

1.4. **Principio del método de ensayo**

Todos los métodos de determinación del punto de ebullición (o del intervalo de ebullición) se basan en la medición de la temperatura de ebullición. A continuación se describen cinco métodos:

1.4.1. *Método del ebullómetro*

Aunque en un principio los ebullómetros se utilizaban 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 (ver apéndice), se describe un aparato muy sencillo. En dicho aparato, el líquido se calienta hasta ebullición a la presión atmosférica (condiciones de equilibrio).

1.4.2. *Método dinámico*

Este método se basa en la medición de la temperatura de recondensación del vapor mediante un termopar que se coloca en el reflujo durante la ebullición. En este método puede modificarse la presión.

1.4.3. *Método de destilación para punto de ebullición e intervalo de ebullición*

Este método se basa en la destilación del liquido, midiéndose la temperatura de recondensación del vapor y determinándose la cantidad de destilado.

1.4.4. *Método de Siwolobov*

Se calienta una muestra en un tubo de ensayo, que se sumerge en un baño de líquido caliente. Se introduce en el tubo de ensayo un capilar cerrado, con un burbuja de aire en su parte inferior.

Se determina la temperatura a la que se escapa del capilar un rosario continuo de burbujas o a la que el rosario de burbujas, al producirse un enfriamiento momentáneo, se interrupe y el fluido comienza de repente a subir por el capilar (Siwolobov).

1.4.5. *Detección fotoeléctrica*

De acuerdo con el principio de Siwolobov, la ascensión de las burbujas permite una medición fotoeléctrica automática.

1.5. **Criterios de cualitativos**

La aplicabilidad y la precisión de los diferentes métodos utilizados para determinar el punto de ebullición intervalo de ebullición se indican en el cuadro 1.

1.6. **Descripción de los métodos**

En las normas internacionales y nacionales (ver Apéndice) se describen los procedimientos de algunos métodos de ensayo.

1.6.1. *Ebullómetro*

Ver Apéndice.

1.6.2. *Método dinámico*

Ver método de ensayo A.4 para la determinación de la presión del 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)*

Ver apéndice.

CUADRO 1: COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS

Método de medición	Precisión aproximada	Observaciones
Ebullómetro	± 1,4 K (hasta 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (por bajo de 373 K) (1) (2)	Norma existente ASTM D 1120-72 (1)
Método dinámico	± 0,5 K (2)	
Método de destilación (intervalo de ebullición)	± 0,5 K	Normas existentes: ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Método de Siwolobov	± 1 K a ± 2 K (2)	
Detección fotoeléctrica	± 0,3 K (a 373 K) (2)	

(1) Esta precisión sólo es válida para aparatos sencillos, como el descrito en la norma ASTM D 1120-72; es posible mejorarla utilizando ebullómetros mas perfeccionados.

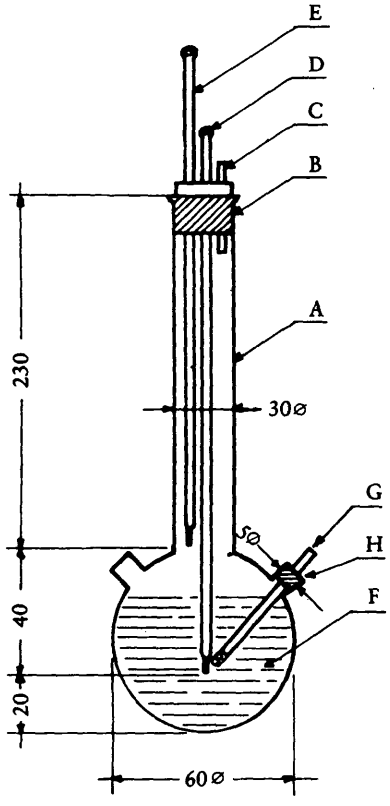
(2) Válido solamente para sustancias puras.

1.6.4. *Método de Siwolobov*

Se introduce la muestra en un tubo de ensayo de unos 5 milímetros de diámetro y se calienta en un aparato apropiado para determinar el punto de fusión (ver 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 ensayo (5 mm de diámetro exterior como máximo)
. Tubo capilar (de unos 100 mm de longitud, 1 mm de diámetro interio, y 0,2 a 0,3 mm de espesor)
H: Tubo lateral

En el tubo de ensayo que contiene la sustancia se sumerge un tubo capilar (capilar de ebullición), cerrado a aproximadamente 1 centímetro de su extremo inferior. La parte tapada del capilar debe guedar situada por debajo de la superfície del líquido. El tubo de ensayo debe estar unido al termómetro mediante un elástico o un soporte lateral (ver figura 2).

Figura 2

Método de Siwolobov

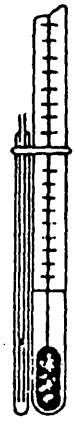
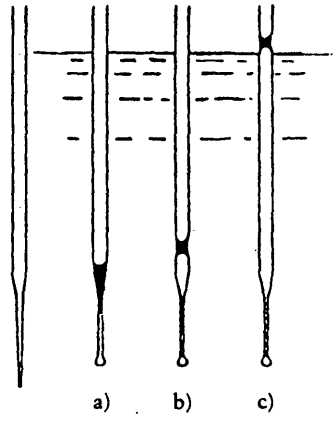


Figura 3

Método modificado



El líquido del baño se elige en función de la temperatura de ebullición. Se puede utilizar ácido sulfúrico o aceite de silicona para temperaturas de hasta 573 K. La parafina líquida sólo es aconsejable 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. Conviene 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 pase de 1 K por minuto. Al acercarse a la temperatura de ebullición, comienzan a salir burbujas del capilar.

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, 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 (ver figura 3), el punto de ebullición se determina en un capilar de punto de fusión. La extremidad inferior de 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. Entonces se tapa la punta encerrando una pequeña burbuja de aire. Al calentarla en el aparato de punto de fusión (b), la burbuja de aire se dilata. El punto de ebullición corresponde a la temperatura a la que la muestra de la sustancia llega al nivel de la supeficie 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 de forma precisa.

Durante el aumento de la temperatura de la muestra, escapan del capilar de ebullición algunas burbujas de aire. Cuando se alcanza la temperatura de ebullición, el número de burbujas aumenta muy rápidamente. La modificación de la intensidad luminosa consiguiente es registrada por la célula, que envía una señal de interrupción al indicador de la temperatura (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) y sin ninguna modificación del aparato. Basta con colocarlo en una cámara fría o en un baño refrigerante. Las fichas técnicas suministradas con el aparato brindan los detalles necesarios para realizar adecuadamente la determinación del punto de ebullición.

2. RESULTADOS

Cuando se trate de diferencias pequeñas respecto a la presión normal (máximo de ± 5 kPa), las temperaturas del punto de ebullición podrán corregirse (T_n) mediante la ecuación de Sidney-Young:

$$T_n = T + f_T \times \Delta p$$

donde

Δp = (101,325 − p) (atención al signo)

p = presión barométrica en kPa

f_T = velocidad 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 corregido de la temperatura de ebullición, en K a presión normal.

Los factores de corrección de la temperatura (f_T) y las ecuaciones para su aproximación figuran en las normas internacionales y nacionales citadas en el texto (válido para numerosas sustancias).

Por ejemplo, el método DIN 53171 presenta las correcciones para los disolventes contenidos en las pinturas:

CUADRO 2: FACTORES DE CORRECCIÓN DE LA TEMPERATURA (f_T)

Temperatura T en K	Factor de correción f_T en K/kPa
323,15	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**

Debe indicarse el método utilizado. El punto de ebullición determinado será la media entre dos mediciones, como minimo, situadas dentro de los límites de precisión aproximativa indicados en el cuadro 1. Si las determinaciones no fueran repetibles, se deberán aplicar otros métodos distintos.

Deber indicarse los valores medidos de los puntos de ebullición así como sus medias y la (s) presión (es) a que se hayan efectuado las mediciones deberá (n) registrarse en kPa.

La presión debe, preferentemente, ser próxima a la presión normal. Cuando la ebullición de una sustancia se extienda en una amplia gama de temperaturas, dicho intervalo de ebullición debe figurar en el informe. Para todos los resultados deberán darse las estimaciones de precisión.

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, Paris, 1981, Tes Guideline 103 — Decisión of the Council C (81) 30 Final.

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 antifreezes
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

A.3. DENSID RELATIVA

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. Introducción

Los métodos de determinación de la densidad relativa descritos son aplicables a las sustancias sólidas y líquidas, cualquiera que sea su grado de pureza. En el cuadro 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, determinada a 20 °C, y la masa del mismo volumen de agua, determinada à 4 °C. La densidad relativa es un número adimensional.

La densidad (p) de una sustancia es el cociente de su masa m por su volumen v.

En unidades SI, la densidad se expresa en kilogramos por metro cúbico.

1.3. Sustancias de referencia (1) (2)

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia.

Deben utilizarse, esencialmente, para calibrar el método de vez en cuando y para poder comparar los resultados.

1.4. Principio de los métodos

Se aplican cuatro 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 sustancias sólidas)

La diferencia entre el peso de una muestra medido en el aire y en 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 el ensayo. 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 de la esfera sumergida (para las sustancias líquidas) (3)

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 una esfera de volumen conocido en dicho líquido.

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 (4) (5) (6).*

La densidad de un líquido se puede medir con un densímetro oscilante, es decir con un oscilador con forma de tubo en U que oscila a una frecuencia específica 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 de densidades conocidas.

Las sustancias deben elegirse de tal manera que sus densidades cubran el intervalo de medición.

1.5. *Criterios cualitativos*

En el cuadro se indica la aplicabilidad de los diferentes métodos que se utilizan para determinar la densidad relativa.

La precisión citada en la norma ISO se refiere únicamente a sustancias puras.

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 una temperatura de 20°C y deben hacerse, al menos, dos medidas.

2. **RESULTADOS**

Ver normas.

3. **INFORME**

Debe indicarse el método o la norma utilizados.

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 1: APLICABILIDAD DE LOS MÉTODOS

Métodos de medida	Densidad		Viscosidad dinámica máxima posible	Observaciones
	sólido	líquido		
1.4.1.1. Areómetro		×	5 Pa s	ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2. Balanza hidrostática				ISO/R 1185 (A)
a) sólidos	×			ISO/R 91 y
b) líquidos		×	5 Pa s	R 758
1.4.1.3. Método de la esfera sumergida		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Picnómetro				
a) sólidos	×		500 Pa s	ISO/R 3507
b) líquidos		×		ISO/R 1183 (B) ISO/R 758
1.4.3. Picnómetro de comparación de aire	×			DIN 55990 parte 3 DIN 53243
1.4.4. Densímetro oscilante		×	5 Pa s	

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of Physico-chemical Properties. — Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 508.

(3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, Vol. 11, 1979, p. 427-430.

(4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, p. 297-302.

(5) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen- Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung. Die Pharmazeutische Industrie, Vol. 37, 1975, p. 717-726.

(6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, p. 253-255.

Apéndice

Para más detalles técnicos, se pueden consultar las normas siguientes:

1. **Método de flotabilidad**

1.1. *Areómetro*

DIN 12790	Hydrometer: general instructions
ISO 387	
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers: standardised sizes, designation
ISO/R 649	
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. *Palanza hidrostática*

Para las sustancias sólidas

ISO R 1183	Method A. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
ASTM-D-792	Specific Gravity and Density of Plastics by Displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastometers; determination of density

Para las sustancias liquidas

ISO R 91	ISO R 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density.

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 et ASTM D 1481-62

ASTM D 1298	Density, Specific gravity or APl gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method
BS 4714	Density, Specific gravity or APl gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method

1.3. *Métodos de la esfera sumergida*

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (enlargement for immersed ball method to be published in 1981)

2. **Métodos picnométricos**

2.1. *Para las sustancias líquidas*

ISO 3507	Pycnometers
ISO/R 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^2s^{-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^2s^{-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

2.2. *Para las sustancias sólidas*

ISO/R 1183	Methods B: Methods for Determining the Density and Relative Density fo Plastics excluding Cellular Plastics
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

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones preliminares referentes a la estructura, punto de fusión y 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 $< 10^{-3}$ Pa a 10^5 Pa.

En general, las impurezas influyen en la presión de vapor. La influencia de las impurezas sobre la determinación de la presión de vapor depende en gran parte de la naturaleza de la impureza. El efecto puede ser considerable si la muestra contiene un disolvente altamente volátil.

1.2. Definiciones y unidades

La presión de vapor de una sustancia es la presión de saturación de la misma, en equilibrio con su fase sólida o líquida. En equilibrio termodinámico, la presión de vapor de una sustancia pura es, únicamente, función de la temperatura.

La unidad SI de presión que se debe utilizar es el Pascal (Newton/ m^2).

Los factores de conexión de las unidades que solían utilizarse en el pasado, son:

1 Torr (mm Hg) = $1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 atmósfera (física, atm) = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 atmósfera (técnica, at) = $9{,}81 \times 10^4$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

La unidad SI térmica es el grado Kelvin (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 fiabilidad del método y para comparar los resultados obtenidos con los de otro método distinto.

1.4. Principio de los métodos

En el presente apartado se exponen cinco 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 Pa hasta 10^5 Pa, entre 20°C y 100°C.

El presente método se ha recomendado, también, para determinar los puntos de ebullición por debajo de 350°C.

1.4.2. *Método estático*

En el presente 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 Pa hasta 10^5 Pa, entre 0°C y 100°C.

1.4.3. *Isoteniscopio*

Se trata, también, de un método normalizado de procedimiento estático, pero que no es aplicable a los sistemas con varios componentes. Se puede encontrar información suplementaria en la norma ASTM D-2879-75.

Intervalo recomendado:

de 10 Pa hasta 10^5 Pa, entre 0°C y 100°C.

1.4.4. *Balanza de presión de vapor*

La cantidad de sustancia vaporizada por unidad de tiempo en un aparato de volumen 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} Pa hasta 1 Pa, entre 0°C y 100°C.

1.4.5. *Método de saturación de gases*

Se envía una corriente de gas portador inerte a través de la sustancia para que aquel se sature, recogiendo el vapor en un colector idóneo. La medida de la cantidad de sustancia transportada por un volumen conocido de gas portador permite calcular la presión de vapor a una temperatura dada.

Intervalo recomendado:

hasta 1 Pa.

1.5. **Criterios cualitativos**

El cuadro siguiente muestra una tabla comparativa de la aplicación, repetibilidad, reproducción, intervalos de medida y posibilidades de normalización de los diferentes métodos de determinación de la presión de vapor.

CUADRO: CRITERIO DE CALIDAD

Método do medida	Sustancia		Estimación de la repetibilidade (1)	Estimación de la reproducción (1)	Intervalo recomendado	Posibilidad de normalización
	sólida	líquida				
1.4.1. Método dinámico		×	hasta 25 %	hasta 25 %	De 10^3 Pa à $2 \cdot 10^3$ Pa	—
			1—5 %	1—5 %	De $2 \cdot 10^3$ Pa à 10^5 Pa	—
1.4.2. Método estático	×	×	5—10 %	5—10 %	De 10 Pa à 10^5 Pa	—
1.4.3. Isoteniscopio	×	×	5—10 %	5—10 %	De 10^2 Pa à 10^5 Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Balanza de presión de vapor	×	×	5—20 %	hasta 50 %	De 10^{-3} Pa à 1 Pa	—
1.4.5. Método de saturación de gases	×	×	10—30 %	hasta 50 %	De < 10^{-3} Pa hasta Pa	—

(1) Según el grado de pureza.

1.6. Descripción de los métodos

1.6.1. *Medida dinámica*

1.6.1.1. Aparato

El equipo de medida consta de un aparato de reflujo con refrigerante de vidrio o de metal (ver figura 1), un dispositivo de regulación y 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 y consta de cinco partes principales:

Un tubo con una sección de doble pared, junta esmerilada, refrigerante, recipiente de enfriamiento y orificio de entrada.

Un cilindro de vidrio unido a una bomba Cottrell, montado en la sección del tubo donde se efectúa la ebullición y de superficie rugosa para evitar las sacudidas durante la misma.

Para medir la temperatura se puede utilizar un termopar o un termómetro de resistencia sumergido en una pequeña cantidad de aceite, el cual se introduce en un tubo de carga equipado con una junta esmerilada macho en su extremo superior y cerrado en su extremo inferior.

Una abertura que permita conectar el dispositivo de regulación y de medida de la presión.

Un volumen-tampón conectado al aparato de medida a través de un tubo capilar.

Un calentador de cartucho introducido en la parte inferior del aparato de vidrio para calentar la columna de ebullición. La corriente necesaria se obtiene mediante un transformador-regulador de voltaje y se controla con un amperímetro.

Una bomba de aceite para conseguir el vacío que se precise (entre 10^2 y 10^5 Pa, aproximadamente).

Para establecer la presión deseada se utiliza una bombona de nitrógeno conectada al aparato mediante una válvula que sirve, también, para ventilar el aparato.

Un indicador de presión de precisión conectado a la abertura para efectuar las medidas.

1.6.1.2. Procedimiento de medida

La presión de vapor se mide determinando el punto de ebullición de la muestra a diversas presiones, comprendidas entre 10^3 Pa y 10^5 Pa, aproximadamente. El punto de ebullición o de equilibrio, en el caso de una mezcla, se alcanza cuando la temperatura se mantiene constante a una presión dada. Este procedimiento de medida no es aplicable a las sustancias que formen espuma.

Antes de efectuar la medida se debe preparar el aparato limpiando minuciosamente y secando al vacío todos sus elementos de vidrio. A continuación, se introduce la sustancia en el aparato. (Cuando los sólidos son en forma de polvo, el llenado puede resultar dificultoso, para facilitarlo se puede calentar el agua del refrigerante). Una vez lleno, se monta el aparato y se extrae el gas de la sustancia. Se regula a la presión más baja prevista, accionando el sistema de calentamiento y conectando, simultáneamente, el termopar o el termómetro de resistencia a un registro. Cuando éste indique una temperatura de ebullición fija, a presión constante, se habrá alcanzado el equilibrio. Una vez registrado, 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) a presiones decrecientes para comprobar los resultados).

1.6.2. *Medida estática*

1.6.2.1. Aparato

El aparato de medida (ver figura 2) se compone de un sistema de calentamiento y un sistema de enfriamiento de vidrio y de metal para llevar la muestra a la temperatura deseada, así como de un dispositivo para regular y medir la presión y la temperatura.

El compartimento que contiene la muestra está unido, por una parte, a una llave de vacío de acero inoxidable y, por la otra, a un tubo en forma de U lleno de un líquido manométrico apropiado. El otro extremo del tubo en U termina en una abertura de tres ramales respectivamente, a la bomba de vacío, a la bombona de nitrógeno y al indicador de presión.

Para poner la muestra a la temperatura deseada, se sumergen en un baño, a temperatura constante, el compartimento depósito, el cuerpo de la llave y una sección suficientemente importante del tubo en U (prácticamente, hasta la altura del cuerpo de la llave). La temperatura se mide y se registra con un termopar o con un termómetro de resistencia colocado muy cerca del exterior del compartimento.

Cuando haya que enfriar mucho la muestra, se utilizará el nitrógeno líquido o una mezcla de nieve carbónica y de alcohol. En este caso, las medidas se efectuarán con un ultracriostato.

Para alcanzar en el aparato la presión prevista, se utilizará una bomba adecuada.

En general, la presión de vapor de una sustancia se mide indirectamente con un indicador de cero. Dicho indicador puede ser un tubo en U con un líquido, como seha dicho antes, o, por ejemplo, un manómetro de diafragma. En un baño de temperatura controlada, la presión de vapor rompe el equilibrio del líquido contenido en el tubo en U. El equilibrio de la presión se restablece introduciendo nitrógeno en el aparato. El indicador de precisión, que se encuentra a la temperatura ambiente, permite medir la presión de nitrógeno utilizada, que corresponde a la presión de vapor de la sustancia a la temperatura constante correspondiente. En el tubo en U, para la regulación de cero, se pueden utilizar diferentes líquidos (mercurio, aceites de siliconas o ftalatos), según la gama de presiones y el comportamiento químico de la sustancia.

El mercurio puede utilizarse para una presión atmosférica de hasta 10^2 Pa, los aceites de silicona y los ftalatos de 10^2 Pa a 10 Pa; en cuanto al manómetro de membrana, puede utilizarse hasta presiones inferiores a 10^{-1} Pa.

1.6.2.2. Método de medida

Antes de medir, se limpian con disolventes y se secan al vacío todas las partes del aparato cuyo esquema aparece en la figura 2.

Se llena el tubo en U con el líquido previsto, al que previamente se le extraído el gas a temperatura elevada. Después de introducir la sustancia, se monta el aparato y se enfría suficientemente el compartimento. Se abre entonces la llave y se hace el vacío en el aparato. Después de unos minutos , se vuelve a cerrar la llave y se pone la muestra a la temperatura deseada, compensado el desplazamiento de las columnas de líquido del tubo en U introduciendo nitrógeno. Entonces se enfría de nuevo la célula. Toda presión residual observada tras dicho enfriamiento se debe a la presencia de determinada cantidad de aire liberada por la muestra durante el callentamiento (dicho aire podrá eliminarse haciendo de nuevo vacío en el compartimento) o a un enfriamento insuficiente. En ese caso habrá que utilizar nitrógeno líquido como refrigerante.

Cuando se haya extraído el suficiente gas de la muestra, la dependencia de la presión de vapor con relación a la temperatura se determinará a intervalos de temperatura bastante próximos.

1.6.3. *Isoteniscopio*

Para una descripción completa de este método consultar la referencia 2. 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. En el caso de los sólidos, se elegirá uno de los manómetros líquidos citados en el punto 1.6.2 teniendo en cuenta las gamas de presión y de temperatura necesarias. La esfera del isoteniscopio para líquidos se llena con la sustancia, a la que previamente se le habrá extraído el gas a temperatura elevada durante la ebullición.

La fracción de sustancia que destila durante esta extracción de gas se condensa en la esfera superior enfriada, de donde cae al tubo en U. Cuando este último contiene una cantidad suficiente de sustancia desgasificada, se sumerge con la esfera inferior en una cubeta termostatizada. Al alcanzar la temperatura prevista, se mide la presión de vapor de forma indirecta según el método descrito en el punto 1.6.2.

En el caso de los sólidos, se llena la ampolla del brazo más largo del isoteniscopio con el liquido desgasificado procedente del manómetro. Se introduce el sólido en la esfera inferior y se desgasifica a temperatura elevada. Entonces se inclina el isoteniscopio de tal manera que el líquido manométrico pueda caer en el tubo en U. La medida de la presión de vapor en función de la temperatura se efectúa según lo descrito en el punto 1.6.2.

1.6.4. *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 claramente los principios del presente método.

Está formado por una bandeja soporte cubierta con una campana de protección, una bomba con dispositivo de medida de vacío y un equipo para determinar la presión de vapor con indicación de la desviación de la aguja. En la bandeja soporte va montado el equipo siguiente:

— un horno de evaporación con abrazadera y alimentador giratorio. Se trata de un recipiente liso y cilíndrico de cobre (o, a veces, de vidrio recubierto de cobre), colocado en una brida de fijación de cobre atornillada a una pieza de acero inoxidable a la altura del reborde inferior. La pieza de acero está a su vez montada sobre la bandeja soporte con una brida para que pueda girar alrededor del eje del horno. El calentamiento se efectuá mediante una resistencia situada en el interior de la pieza de acero inoxidable y, por lo tanto, aislada de la cámara de vacío.

— la tapa del horno es de cobre y tiene tres orificios de evaporación de diferentes secciones, situados a 90 grados uno del otro. Haciendo girar el horno, se puede colocar el orificio elegido, o un punto intermedio bajo la hendidura del refrigerador, colocado excéntricamente con respecto al horno, lo que permite centrar el haz molecular en el platillo de la balanza o desviarlo. En la pared del horno hay un termopar o un termómetro de resistencia para medir la temperatura,

— la balanza es un instrumento de bobina móvil. La manecilla se sustituye por un tubo pequeño en el que van montados el fiel y el contrapeso. El fiel tiene un platillo intercambiable formado por una fina capa de aluminio recubierto de oro. Aproximadamente en el centro del fiel se coloca un hilo de constantán de 0,1 milímetros de grosor del que se suspenden las pesas usadas para calibrar. La presión de vapor puede registrarse mediante un dispositivo fotoeléctrico de punto cero.

— un cilindro de latón rodea el platillo de la balanza completamente, a excepción de dos hendiduras que permiten el movimiento del fiel y de una abertura estrecha para la entrada del haz molecular. La disipación del calor hacia el exterior se consigue con una barra de cobre que, arrancando de la parte más alta del cilindro, atraviesa la bandeja soporte por un tubo de acero inoxidable térmicamente aislado. Por debajo de la bandeja soporte, la barra se sumerge en un recipiente Dewar con nitrógeno líquido.

1.6.4.2. Método de medida

El horno de cobre se llena con la sustancia, se cierra la tapa y se sitúan encima del horno, el orificio de la bandeja, el escudo y el refrigerante. Se pone la campana en su sitio y se conectan las bombas de vacío. La presión que se debe obtener antes de efectuar la medida es, aproximadamente, de 10^{-4} Pa; a partir de 10^{-2} Pa, comienza el enfriamiento del recinto de refrigeración.

Pasado cierto tiempo, la balanza adquiere una temperatura suficientemente baja para que el chorro de vapor que sale se condense en el platillo. Dicha condensación produce una señal en el registro conectado a la balanza. Esta señal se puede utilizar de dos maneras diferentes: en lo referente al aparato descrito aquí, la presión de vapor se determina directamente a partir de la presión ejercida sobre el platillo de la balanza (no es necesaria la masa molecular). Al mismo tiempo, se determina la masa condensada y, por lo tanto, se puede calcular la velocidad de evaporación a partir del tiempo de deposición. Esto es aplicable a los aparatos más comunes. La presión de vapor también puede calcularse a partir de la velocidad de evaporación y de la masa molecular, mediante la ecuación de Hertz:

$$p = G \sqrt{\frac{2 \pi RT \times 10^3}{M}}$$

donde

G = velocidad de evaporación (kg/s . m^2)

M = masa molecular (g/mol)

T = temperatura (K)

R = constante universal de los gases perfectos (J/mol.K)

p = presión de vapor (pa).

Cuando se consigue el vacío necesario, se realiza una serie de medidas a la temperatura más baja prevista. Al abrir el orificio preciso, el chorro de vapor atraviesa el escudo, montado directamente sobre la tapadera, y va a dar contra el platillo refrigerado de la balanza cuyo dimensionado debe permitir recoger integramente el chorro. El impulso del chorro de vapor ejerce una fuerza sobre el platillo, donde, al contacto con la superficie fria, se condensa las moléculas. Esta fuerza desvía el fiel de la balanza de su posición de equilibrio. En el extremo del fiel, hay una laminilla que permite registrar ópticamente mediante un sistema de prisma y dos fotodiodos. Un circuito de control coloca de nuevo, momentáneamente, el fiel en su posición de equilibrio. Se registra el par necesario que corresponderá, después de calibrar con las pesas, a la presión de vapor de la sustancia.

En las medidas siguientes, se aumenta la temperatura a pequeños intervalos hasta el momento en que se consiga el valor más alto previsto. Entonces se enfría la muestra una vez más y puede registrarse una segunda curva de presión de vapor. Las dos series de medidas sólo serán reproducibles si la muestra es suficientemente pura. Si el tercer intento no confirma los resultados de la segunda, es posible que la sustancia se descomponga en el intervalo de temperaturas previstas para la determinación.

1.6.5. *Método de saturación de los gases*

1.6.5.1. Aparato

El aparato utilizado en el presente método se compone de cierto número de elementos los cuales se representan en la figura 5 y se describen a continuación (1).

Gas inerte:

El gas de arrastreno debe reaccionar con la sustancia a ensayar. El nitrógeno sirve en la mayoría de los casos pero, a veces, pueden utilizarse otros gases. En cualquier caso, el gas elegido debe ser seco (ver figura 5 número 4: Sonda de humedad relativa).

Control de flujo gaseoso:

Un sistema adecuado de control de gases es indispensable para lograr un flujo constante y suficiente 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 utilizarán absorbentes sólidos.

Intercambiador de calor:

Para determinaciones a diferentes temperaturas, quizá sea necesario disponer de un intercambiador de calor.

Columna de saturación:

La sustancia, una vez disuelta, se reparte sobre un soporte inerte que se introduce luego 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 20°C, se debe calentar el espacio entre la columna y los colectores para impedir la condensación de la sustancia.

1.6.5.2. Método de medición

Preparación de la columna de saturación:

Una vez disuelta en un disolvente muy volátil, parte de la sustancia se añada a un volumen dado 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 rotovapor 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.

Medida

Se conectan los colectores a los tubos de salida de la columna y se registra el tiempo. Se comprueba 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, bien:

a) intercalando un indicador de presión entre el saturador y los colectores (en razón del aumento del espacio muerto y de la superficie de absorción);

o bien

b) determinado 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 ebullidores 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. Antes de calcular la presión de vapor a una temperatura dada, conviene efectuar pruebas preliminares para determinar la velocidad de flujo a la que el gas de arrastre se saturará por completo con el vapor de la sustancia. Para ello es preciso que el gas de arrastre pasa a través del saturador con la suficiente lentitud para que no exista la posibilidad de que una velocidad más reducida determine una presión de vapor 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 volumen de gas conocido.

1.6.5.3. Cálculo de la presión de vapor

La presión de vapor se calcula a partir de la densidad de vapor (m/V), por medio de la ecuación siguiente:

$$p = \frac{m}{V} \times \frac{RT}{M}$$

donde

p = presión de vapor en (Pa)

m = masa de la sustancia absorbida en (g)

V = volumen de gas saturado en (m^3)

R = constante universal de los gases perfectos (J/mol . K)

T = temperatura en (K)

M = masa molecular en (g/mol).

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 antes del colector de vapor, pueden ser necesarias ciertas correcciones para tener en cuenta la evaporación de los productos contenidos en los colectores (1).

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

Si es posible, conviene incluir en el informe, las precisiones siguientes:

— descripción precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— al menos, dos valores de presión de vapor y temperatura, a ser posible entre 0°C y 50°C. Se deben incluir también todos los datos brutos y una curva log p en función de 1/T. Además, es necesaria una estimación de la presión de vapor a 20°C o a 25°C.

En caso de modificación (cambio de estado, descomposición):

— descripción de la modificación,

— temperatura a la que se produce ésta a la presión atmosférica,

— presión de vapor a 10°C y a 20°C por debajo de la temperatura de transformación, así como a 10°C y 20°C por encima de dicha temperatura (excepto en el caso de paso del estado sólido al estado gaseoso).

Deben señalarse todas las informaciones y observaciones útiles para la interpretación de los resultados.

Debe precisarse el método utilizado.

4. BIBLIOGRAFIA

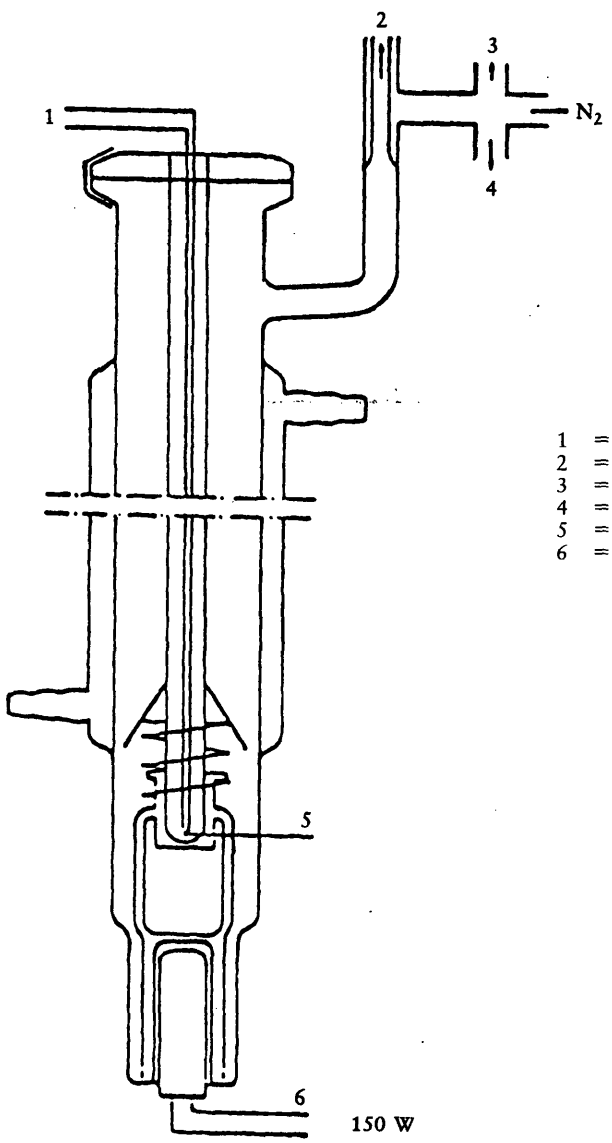
(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 104. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 104, ref (4). Decision of the Council C (81) 30 Final.

Apéndice

Figura 1

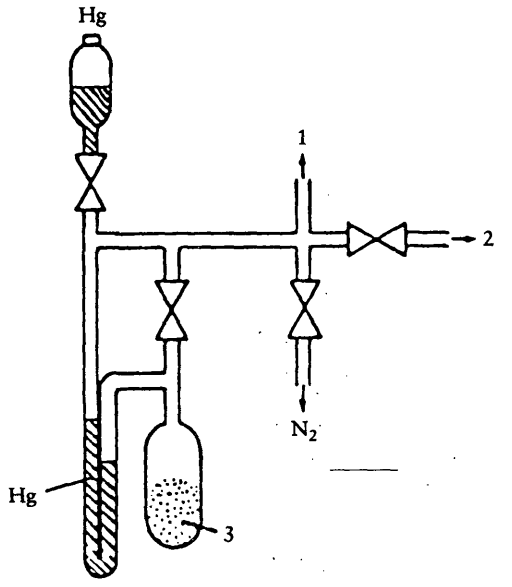
Aparato para determinar la presión de vapor, según el método dinámico



1 = Termopar
2 = Volumen tampón
3 = Indicador de presión
4 = Vacío
5 = Punto de medida
6 = Elemento de calor de unos 150 W

Figura 2

Aparato para determinar la presión de vapor según el método estático

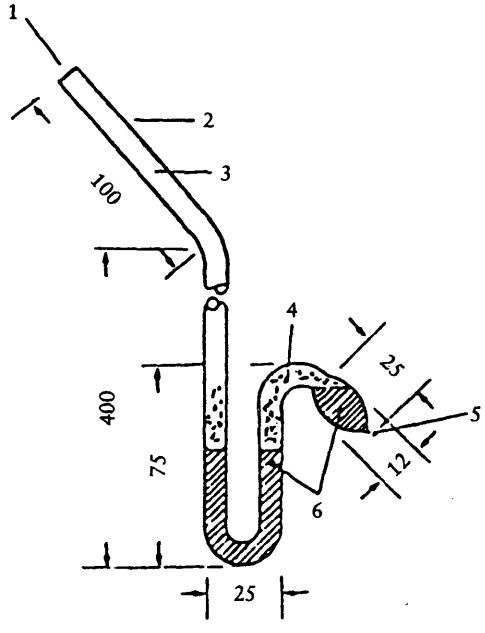


1 = Indicador de presión
2 = Vacío
3 = Muestra

Figura 3

Isoteniscopio

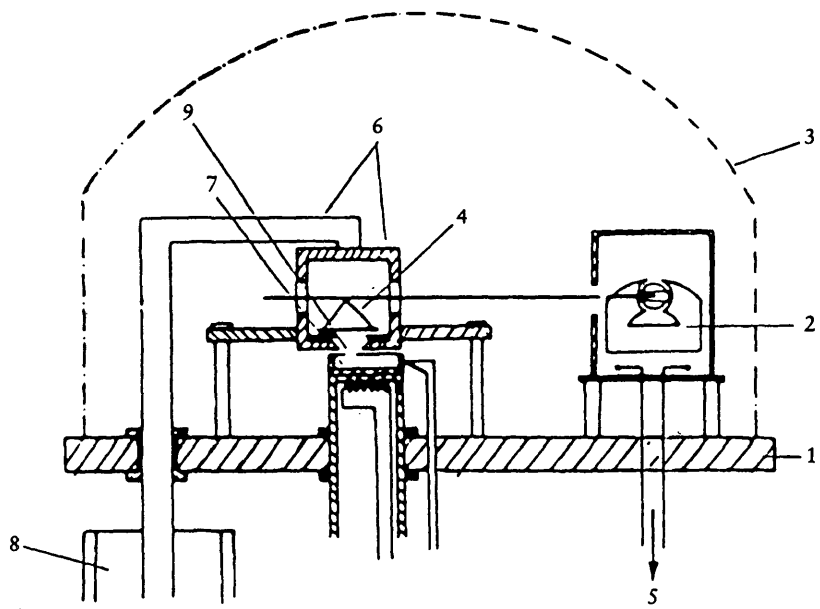
Referencia (2)



1 = Sistema de control de la presión
2 = Tubo de 8 mm de diámetro exterior
3 = Nitrógeno seco
4 = Vapor de la muestra
5 = Brazo corto
6 = Muestra líquida

Figura 4

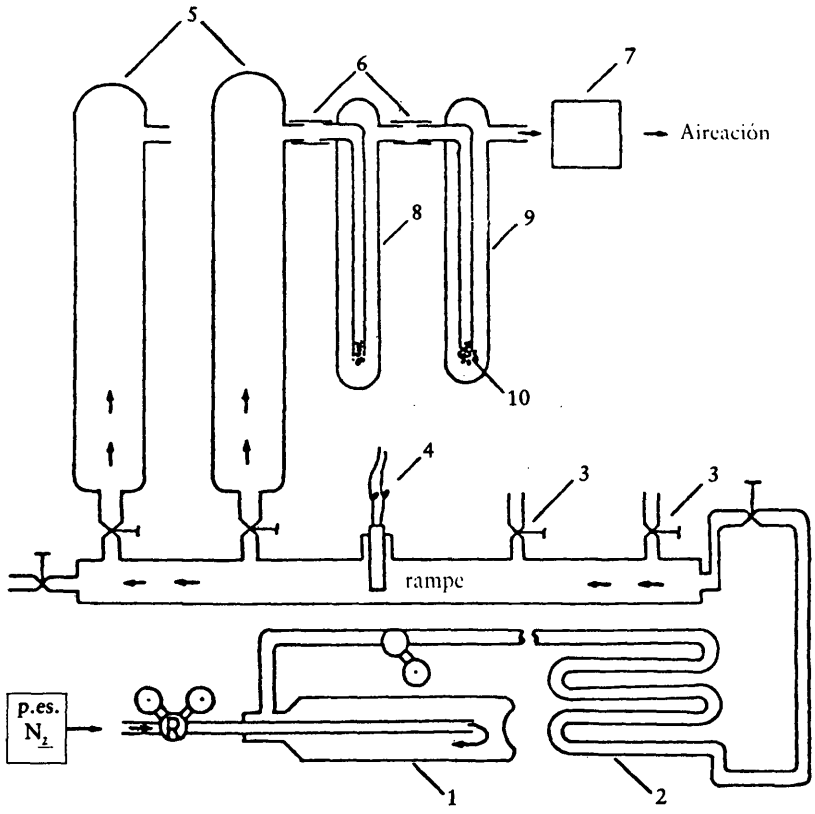
Aparato para determinar la curva de presión de vapor, según el método de la balanza de presión de vapor



1 = Bandeja soporte
2 = Instrumento de bobina móvil
3 = Campana de protección
4 = Balanza de platillo
5 = Dispositivo de medición del vacío
6 = Recinto de refrigeración
7 = Horno de evaporación
8 = Dewar con el nitrógeno líquido
9 = Escudo

Figura 5

Modelo de aparato que permite determinar la presión de vapor, por el método de saturación de los gases



1 = Regulador de flujo
2 = Intercambiador de calor
3 = Válvulas de aguja
4 = Sonda de humedad relativa
5 = Columnas de saturación
6 = Juntas PTFE
7 = Medidor de flujo
8 = Colector (absorbente)
9 = Colector (aceite)
10 = Medidor de flujo a burbuja

A.5. TENSIÓN SUPERFICIAL

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1).

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 informaciones preliminares sobre la solubilidad en el agua, la estructura, las propiedades de hidrólisis de la sustancia y la concentración crítica para la formación de las micelas.

Los siguientes métodos son aplicables a la mayor parte de las sustancias químicas, cualquiera que sea su grado de pureza.

La medida 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 libre de superficie 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 (su utilización ya no está autorizada).

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 calibrar el método de vez en cuando y para poder comparar los resultados cuando se aplique otro método distinto.

En las referencias (1) y (2) se señalan sustancias de referencia que cubren una amplia gama de tensiones superficiales.

1.4. Principio de los métodos

Los métodos se basan en la medida de la fuerza máxima que es preciso ejercer verticalmente sobre una brida o sobre un 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 conseguir separar la película formada.

1.5. Criterios cualitativos

La precisión de los métodos descritos es mayor de la que normalmente se requiere para la protección del medio ambiente.

1.6. Descripción de los métodos

1.6.1. *Método de la placa*

Ver ISO 304 (Tensioactivos determinación de la tensión superficial por separación de las películas líquidas).

1.6.2. *Método de la brida*

Ver ISO 304 (Tensioactivos determinación de la tensión superficial por separación de las películas líquidas).

1.6.3. *Método del anillo*

Ver ISO 304 (Tensioactivos determinación de la tensión superficial por separación de las películas líquidas).

1.6.4. *Método del anillo OCDE armonizado*

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 a ensayar. Va montado en la misma peana que el dinamómetro.

1.6.4.1.2. Dinamómetro

El dinamómetro (ver 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 $\pm 0{,}1$ miligramos 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.

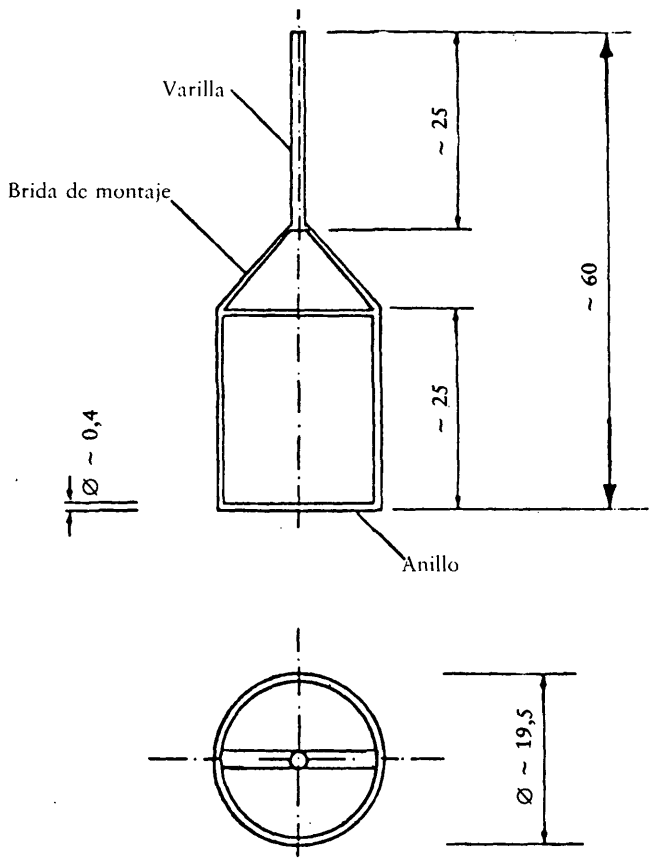
1.6.4.1.3. Cuerpo de medida (anillo)

El anillo suele estar formado por un hilo de platino o de platino-iridio de 0,4 milímetros de grosor, aproximadamente, y una circunferencia media de 60 milímetros. Dicho anillo está suspendido horizontalmente de la brida de montaje que va unida por una varilla metálica al dinamómetro (ver 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 a ensayar debe ser un recipiente de vidrio termostatizado. Debe estar concebido de manera que, durante la determinación, la temperatura superficial del liquido y de la fase gaseosa se mantenga constante y no haya evaporación. Los recipientes cilíndricos de vidrio de un diámetro interior de almenos, 45 milímetros 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 fuera necesario se lavarán con mezcla crómica 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 una reacción neutra; finalmente, se secarán o bien se enjuagarán con parte del líquido que se va a medir.

El anillo se limpiará primero con abundante agua corriente para eliminar todos los restos de sustancias solubles en agua, se sumergerá unos segundos en mezcla crómica, se enjuagará con agua bidestilada hasta que se obtenga una 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 crómica 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 verificación del aparato consiste en comprobar el punto cero y en regularlo de tal magnera 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 regulación.

Regulación del punto cero:

Después de montar el anillo en el aparato y antes de sumergirlo en el liquido, debe regularse a cero el indicador del tensiómetro; se comprobará el paralelismo del anillo utilizando la superficie del liquido como espejo.

Calibrado:

El calibrado del aparato puede hacerse con uno de los dos métodos siguientes:

a) con una masa: este procedimiento consiste en utilizar horquillas de masa conocida (entre 0,1 g y 1,0 g), que se colocan sobre el anillo. El factor de calibrado Φ_a, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del instrumento, se determinará mediante la ecuación (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

donde:

$\sigma_r = \frac{m.g}{2b}$ (mN/m)

m = masa de la horquilla (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 de la horquilla sobre el anillo (mN/m);

b) con agua: este procedimiento utiliza agua pura cuya tensión superficial, por ejemplo a 23°C, sea 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 los restos de tensioactivos.

El factor de calibrado Φ_b, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del aparato, se determinará mediante la ecuación siguiente (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

donde:

σ_o = valor dado en la bibliografia 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 muestras

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 asi preparada debe mantenerse a una temperatura constante (± 0,5°C). Dado que la tensión superficial de una solución colocada en el recipente 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 disolución 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 apenas sumergido bajo la superficie de la solución. Entonces, se vuelve a bajar gradual y uniformemente (a una velocidad de unos 0,5 centimetros por minuto) el portamuestras hasta llegar a una fuerza maxima. La capa de liquido adherida al anillo no debe desprenderse del mismo. Una vez acabadas las medidas, se sumerge de nuevo el anillo y se repiten las medidas hasta llegar a una 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 liquido.

2. **RESULTADOS**

Para calcular la tensión superficial se multiplicará primero el valor leido en el aparato en mN/m por el factor de calibrado $\Phi_o \Phi_b$ (según el procedimiento de calibrado utilizado). Se obtendrá entonces un valor aproximado que, a continuación, deberá corregirse.

Harkins y Jordan (3) han establecido de manera empirica 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 liquido 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 la 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 horquillas (ver punto 1.6.4.2.2. letra a)	Calibrado con agua (ver punto 1.6.4.2.2. letra 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	67,7
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, similar a la norma DIN (DIN 53914) para agua y soluciones acuosas (densidad ρ a 1 g/cm³), y se ha utilizado un anillo existente en el mercado cuyas dimensiones son R = 9,55 milímetros (radio medio del anillo) y r = 0,185 milímetros (radio del hilo que constituye el anillo). La tabla da los valores corregidos de las medias de tensión superficial efectuadas tras un calibrado con horquillas o con agua pura.

Otra solución 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 = la fuerza medida en el dinamómetro en el punto de ruptura de la película

R = radio del anillo

f = factor de corrección (1).

3. INFORME

El informe debe contener, si es posible, las informaciones siguientes:

— el método utilizado: método armonizado con el tensiómetro de anillo, ISO u OCDE,

— el tipo de agua o de solución utilizada,

— la descripción precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— los resultados de las medidas: tensión superficial (leída) incluyendo a la vez las diferentes lecturas y su media arithmética, así como el valor medio corregido (teniendo en cuenta el factor especifico del equipo y la tabla de corrección),

— la concentración de la solución,

— la temperatura del ensayo,

— el tiempo de la solución empleada, en particular, el tiempo transcurrido entre la preparación de la solución y su medida,

— la evolución de la tensión superficial de la solución en función del tiempo a partir del momento en que 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 fisico de la sustancia.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 115 — Decision of the Council (81) 30 Final.

(2) Pure and Applied Chem, Vol. 48, 1976, p. 511

(3) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., Vol. 52, 1930, p. 1751.

A.6. HIDROSOLUBILIDAD

1. MÉTODOS

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1),

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones sobre la fórmula desarrollada, la presión de vapor, la constante de disociación y la hidrólisis (función del pH) de la sustancia antes de proceder al ensayo.

No existe un método que cubra toda la gama de solubilidades en el agua.

El método no es aplicable a las sustancias volátiles.

Con los dos métodos de ensayo descritos a continuación se puede abarcar la gama completa:

— el primero, denominado en lo sucesivo « método por 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 elevada ($> 10^{-2}$ 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 en 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/m^3 (se puede utilizar también g/l).

1.3. Sustancia 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 calidad del método y permitir la comparación de los resultados cuando se utilice otro método distinto.

1.4. Principio del método de

La cantidad aproximada de muestra y el tiempo necesario para conseguir la concentracion de saturación en masa, deben determinarse mediante un ensayo preliminar sencillo.

1.4.1. *Método por elución en columna*

Este método se basa en la elución con agua de la sustancia a ensayar mediante una microcolumna llena de un material soporte inerte como, por ejemplo, bolas de cristal, gel de silicio o arena, y cargada hasta el exceso de sustancia a ensayar. La hidrosolubilidad se determina cuando la concentración en masa del eluato es constante. Se indica con una recta de concentración en función del tiempo.

1.4.2. *Método del 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 (2). Luego, se determina con un método analítico apropiado la concentración en masa de la sustancia en la solución acuosa.

1.5. **Criterios cualitativos**

1.5.1. *Repetibilidad*

En lo que respecta al método por elución en columna, la repetibilidad que se puede conseguir es inferior al 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, como mínimo.

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%/°C), se utilizarán 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 del equipo en las que cualquier variación de temperatura pueda influir en el ensayo.

1.6.2. *Ensayo preliminar*

En una probeta de 10 mililitros calibrada y cerrada, que contengo 0,1 gramos de muestra (las sustancias sólidas deber 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, luego comprobar visualmente si contiene partículas de muestra no disueltos. Si después de añadir 10 mililitros de agua, la muestra o determinadas partes de ésta, no se han disueltos, pasar el contenidos de la probeta graduada a un probeta graduada de 100 mililitros, llenarla por completo de agua y agitarla. Si la solubilidad es escasa, el tiempo necesario para disolver la sustancia puede ser considerablemente más largo (unas 24 horas). La solubilidad aproximada se indica, en el cuadro, bajo el volumen de agua añadido en que se efectuá la disolución completa de la muestra. Si la sustancia se mantiene, según todas las apariencias, insoluble, se debe proceder a una nueva dilución a fin de determinar si hay que utilizar el método por elución en columna o el método por solubilidad en frasco.

1.6.3. *Método por elución en columna*

1.6.3.1. Material soporte, disolvente y eluyente.

En el método por elución en columna, el material soporte debe ser inerte. Se pueden emplear bolas de cristal o de silicio. Para aplicar la sustancia a ensayar al soporte, se utilizará un disolvente de laboratorio, por ejemplo, agua bidestilada procedente de un aparato de vidrio cuarzo.

Observación

No utilizar agua procedente directamente de un intercambiador de iones orgánico.

1.6.3.2. Carga del soporte

Pesar y traspasar 600 miligramos de material soporte a un matraz de fondo redondo de 50 mililitros.

Disolver una cantidad idonea, pesada, de la sustancia a ensayar en el disolvente elegido. Añadir al soporte una cantidad adecuada de la solución de la sustancia a ensayar. El disolvente debe evaporarse por completo, por ejemplo en un rotavapor a fin de asegurar la saturación en agua del soporte, saturación que, de lo contrario, no se daría debido al efecto de distribución en la superficie del soporte.

La carga del soporte puede plantear problemas (resultados erróneos) si la sustancia a ensayar se deposita en forma de aceite o en una fase cristalina diferente. El problema debería examinarse experimentalmente.

Dejar el soporte cargado de esta forma durante unas 2 horas en 5 mililitros de agua, aproximadamente, y luego pasar la suspensión a la microcolumna. También se podrá verter en esta última el soporte cargada en seco, después de haber llenado previamente la microcolumna de agua y haberla equilibrado después, durante unas 2 horas.

Procedimiento:

La elución de la sustancia a partir del soporte puede efectuarse mediante dos sistemas diferentes:

— bomba de recirculación (ver figura 1),

— recipiente de agua (ver figura 4).

1.6.3.3. Método por elución en columna con bomba de recirculación

Aparatos:

En la figura 1 muestra el esquema de un sistema que se utiliza normalmente. La figura 2 representa una microcolumna idonea, pero cualquier otra de dimensiones diferente es aceptable, siempre que se mantengan los criterios de reproducibilidad y de sensibilidad. La columna debe tener un volumen tampón correspondiente al menos a 5 volúmenes de lecho soporte, más un mínimo de cinco muestras. No obstante se puede reducir la dimensión si los cinco volúmenes citados, eliminados con las impurezas, se sustituyen por disolvente de relleno.

La columna debe estar unida a una bomba de reciclado que garantice un caudal aproximado de 25 mililitros por hora. Las conexiones de la bomba son de politetrafluoretileno y/o vidrio. La columna y la bomba, cuando estén unidas, deben permitir la toma de muestras del efluente y el equilibrio a presión atmosférica del recipiente. El material de la columna se sostiene con un pequeño tapón de lana de vidrio (5mm) que servirá también para filtrar las partículas. Como bomba de recirculación se podrá utilizar, por ejemplo, una bomba peristáltica (procurar que el material del tubo no tenga ninguna contaminación ni absorción) o una bomba de membrana.

Procedimiento de medida:

Se inicia la circulación en la columna. El caudal recomendado es de 25 militros por hora, aproximadamente (unos 10 volúmenes por hora para la columna arriba descrita). Los cinco primeros volúmenes (mínimo) se descartan a fin de eliminar las impurezas solubles en el agua. Luego se conecta la bomba de reciclado, haciendo funcionar el aparato hasta llegar al estado de equilibrio, definido por cinco muestras sucesivas cuyas concentraciones no difieran de forma aleatoria en más del ± 30 %. Dichas muestras deben estar separadas entre si por un intervalo de tiempo correspondiente al paso de al menos 10 volúmenes de capa soporte.

1.6.3.4. Método por elución en columna con recipiente tampón

Aparatos (ver figuras 3 y 4):

Recipiente: la unión con el recipiente se hace con una conexión previamente comprobada, unida a su vez a un tubo de politetrafluoretileno. Caudal recomendado: unos 25 mililitros por hora. Se recogerán los sucesivos cluatos y se analizarán según el método elegido.

Procedimiento de medida:

Para determinar la hidrosolubilidad se utilizarán las fracciones procedentes del intervalo de elución cuyas concentraciones sean constantes (± 30 %) al menos en cinco fracciones consecutivas.

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 reducirá una vez más éste a la mitad hasta que se obtenga la misma solubilidad en dos operaciones sucesivas.

En los dos casos (bomba de circulación o recipiente de agua), se debe controlar la posible presencia de materia coloidal en las fracciones detectándolas mediante el efecto Tyndall (difusión de la luz). La presencia de tales partículas falsea los resultados y el ensayo deberia repetirse mejorando la acción de filtración de la columna. Anotar el pH de cada muestra. Efectuar una segunda operación a la misma temperatura.

1.6.4. *Método por solubilidad en frasco*

1.6.4.1. Aparatos

Para este método se requiere el material siguiente:

— objetos de vidrio e instrumentación de laboratorio normales,

— dispositive adecuado para agitar las disoluciones a temperaturas constantes controladas,

— centrifugadora preferiblemente termostatizada y, si fuere necesario, con emulsión,

— 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. Pesar una cantidad de material cinco veces superior a la cantidad determinada antes de introducirla en cada uno de los tres recipientes de vidrio con tapón, también de vidrio (por ejemplo tubos de centrifugar matraces). Añadir en 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, 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 del compuesto 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 progresion, repetir de nuevo todo el ensayo utilizando tiempos de equilibrado más largos.

Debe anotarse el pH de cada muestra.

1.6.5. *Análisis*

Para efectuar estas determinaciones es prefereible 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. Métodos, a título de ejemplo: cromatografía en fase gaseosa o líquida, métodos titrimétricos, métodos fotométricos, métodos voltamétricos.

2. RESULTADOS

2.1. **Método por elución en columna**

En cada operación debe calcularse el valor medio, determinado al menos sobre cinco muestras consecutivas tomadas durante el momento de mayor saturación, así como la desviación standard.

2.2. **Método del frasco**

Deben indicarse los resultados individuales para cada uno de los tres frascos; se hará la media y se expresarán en unidades de masa por volumen de solución los resultados considerados como constantes (repetibilidad inferior al 15 %). 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 por elución en columna**

Se procurará incluir en el informe los resultados del ensayo preliminar, así como lo siguiente:

— descripción precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— concentraciones individuales, rendimientos y pH de cada muestra,

— desviaciones media y standard de la recta de saturación de al menos cinco muestras, para cada operación,

— media de dos operaciones consecutivas aceptables,

— temperatura del agua durante el proceso de saturación,

— método de análisis utilizado,

— naturaleza del soporte,

— cantidad de sustancia depositada en el soporte,

— disolvente utilizado,

— indicación de la inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo y método utilizado,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados.

3.2. **Método del frasco**

Se procurará incluir en el informe lo siguiente:

— descripción 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 para los diferentes matraces cuando concuerden,

— temperatura del ensayo,

— método analítico utilizado,

— indicación de la inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo y método utilizado,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 105. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 116. Decision of the Council C (81) 30 Final.

Apéndice

Figura 1

Esquema del sistema de ensayo

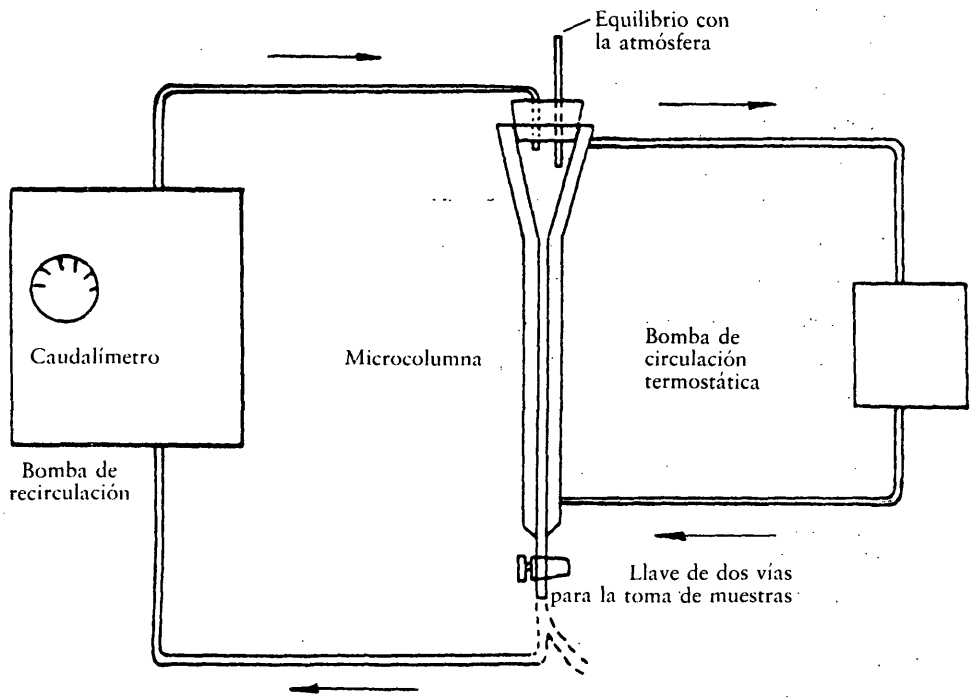


Figura 2

Microcolumna tipo

(dimensiones en milímetros)

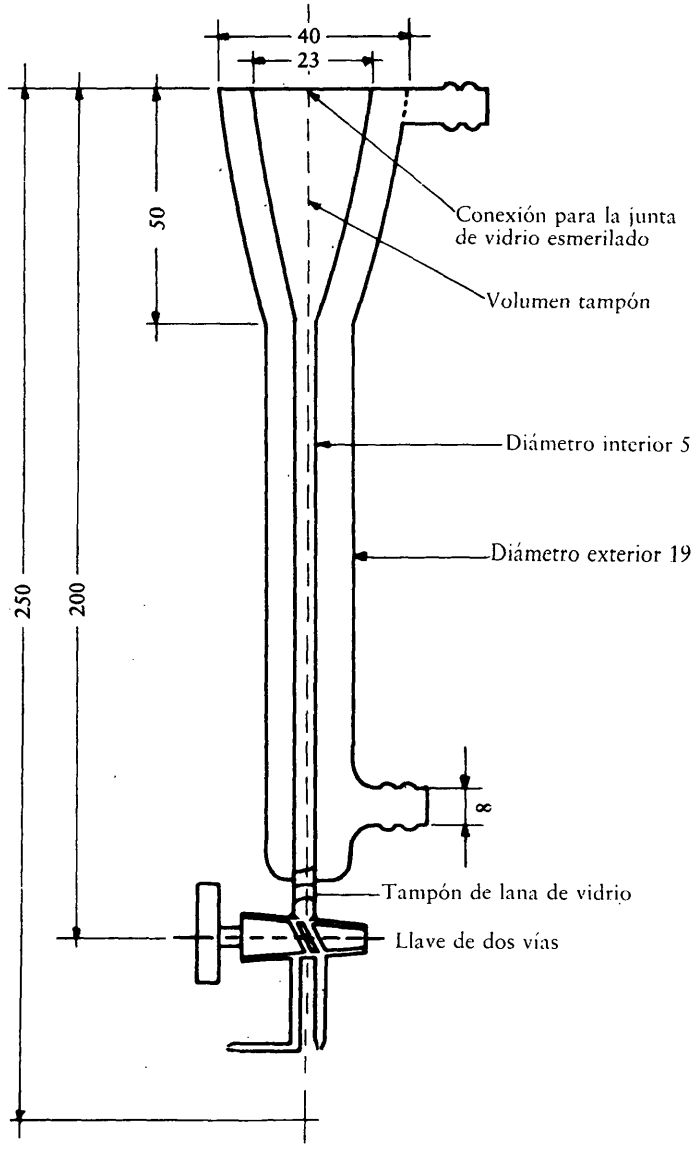


Figura 3

Microcolumna tipo

(dimensiones en milímetros)

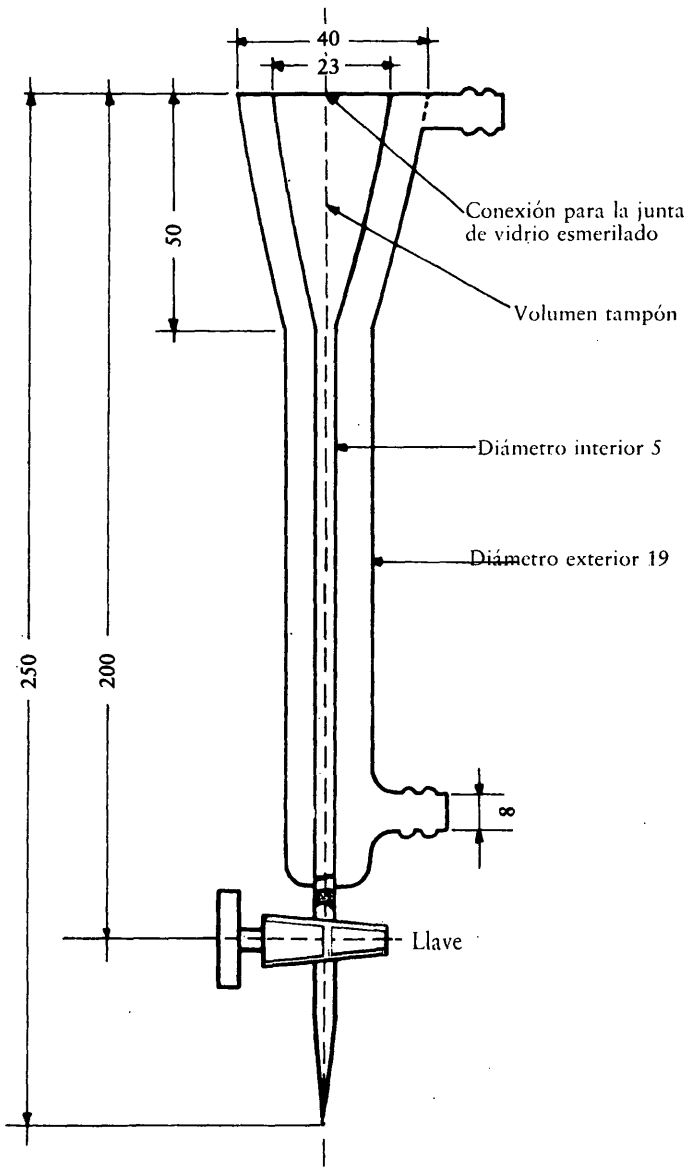
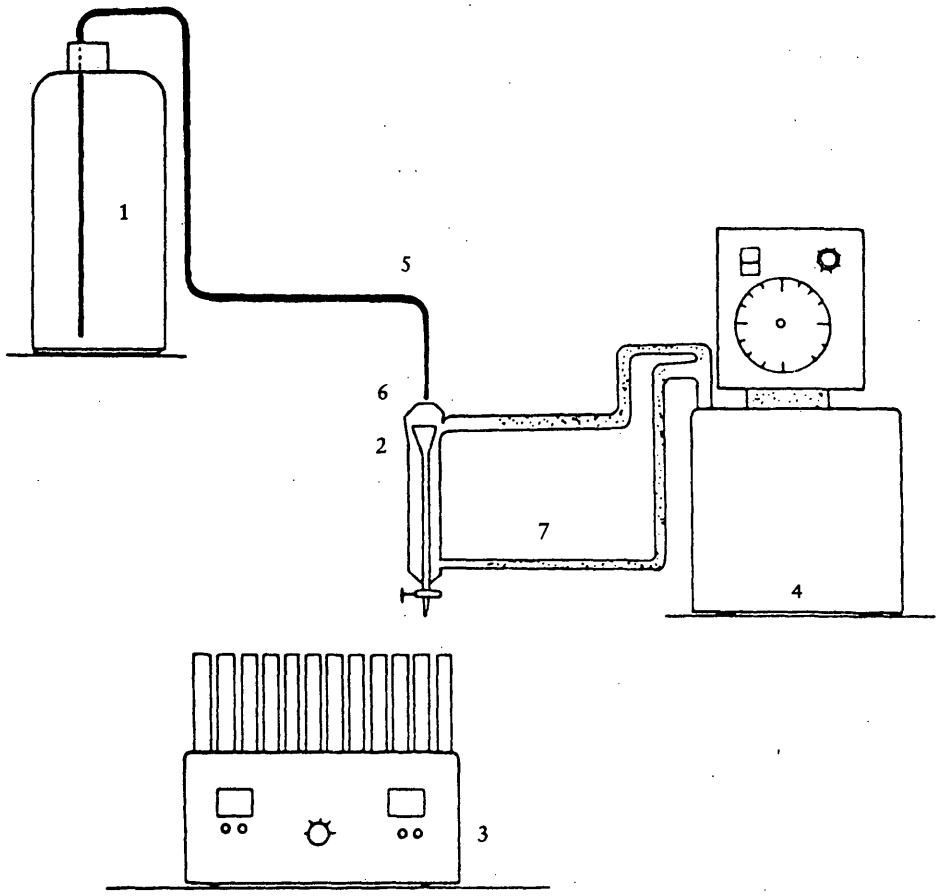


Figura 4

Equipo experimental para la determinacion de la hidrosolubilidad de las sustancias ligeramente solubles y poco volátiles



1 = Recipiente de agua (por ejemplo, un frasco de 2,5 l de capacidad)
2 = Columna (ver figura 3)
3 = Colector de fracciones
4 = Termostato
5 = Tubo de teflon
6 = Tapón de vidrio esmerilado
7 = Tubo para la circulación de agua entre el termostato y la columna de un diámetro interior de, aproximadamente, 8 milímetros

A.7. LIPOSOLUBILIDAD

1. MÉTODO

El método descrito se basa en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones preliminares sobre el coeficiente de reparto la hidrosolubilidad, la fórmula desarrollada y la estabilidad a 50°C antes de la sustancia de proceder al ensayo. Este método solo es aplicable a las sustancias esencialmente puras, estables a 50°C y no significativamente volátiles bajo esas mismas condiciones.

No es adecuado para las sustancias que, en las condiciones de ensayo, reaccionen con lo triglicéridos.

1.2. Definiciones y unidades

La fracción de masa de una sustancia que forma una fase homogénea con una grasa líquida (aceite) sin dar lugar a reacciones químicas recibe el nombre de liposolubilidad. El valor maximo de dicha fracción se llama fracción de saturación y es función de la temperatura.

La fracción de saturación de una sustancia debe indicarse en miligramos por 100 gramos de grasa patron a 37°C ± 0,5°C.

Entre la solubilidad en gramo por 100 gramos de disolución (S') y la solubilidad en gramos por 100 gramos de disolvente (S) existe la relación siguiente:

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 p de grasa standard}$$

Multiplicando S por 1 000 se obtiene la solubilidad en miligramos por 100 gramos de grasa patrón.

1.3. Sustancia de referencia

No es preciso utilizar sustancias de referencia cada vez que se analiza una nueva sustancia. Deben servir esencialmente para verificar de vez en cuando la calidad del método y para permitir comparar los resultados cuando se utilice un método distinto.

1.4. Principio del método

Se coloca la sustancia en una «grasa patrón» líquida y se agita. Debe añadirse la suficiente cantidad de sustancia para que haya exceso. La cantidad de sustancia disuelta se determina mediante un método analítico adecuado.

1.5. Criterios cualitativos

1.5.1. *Especificidad*

La repetibilidad de la medida no se conoce todavía.

Los resultados se aplican a las grasas patrón y a sustancias relativamente puras. Incluso a 37°C las grasas pueden formar emulsiones o suspensiones finas de sustancias sólidas. Dado qui interfieren en la determinacón ulterior de la fracción de la masa, su formación debe evitarse.

1.6. **Descripción del método**

1.6.1. *Preparación*

1.6.1.1. Aparatos

Equipo necesario:

— objetos de vidrio de laboratorio normales,

— balanza,

— centrifugadora con termostato,

— agitador equipado con un sistema de control de la temperatura,

— termostato.

1.6.1.2. Grasas patrón

Es necesaria la utilización de grasas patrón. Estas deberán ser fácilmente definibles. En el apéndice figura un ejemplo.

1.6.1.3. Ensayo preliminar

Debe efectuarse un ensayo preliminar para determinar la cantidad aproximada de sustancia necesaria para obtener la fracción de saturación en masa a la temperatura de ensayo (37°C).

Nota

En el caso de las sustancias sólidas, el tiempo necesario hasta la consecución del equilibrio de saturación puede depender en gran medida de su granulosidad. Por eso, estas materias deben reducirse a polvo.

1.6.1.4. Preparación de la sustancia

Pesar ocho muestras y verterlas en ampollas de 50 mililitros. Normalmente, la cantidad de cada una de dichas muestras debe ser el doble de la necesaria para la saturación, la cual se habrá determinado en el ensayo preliminar.

Tras añadir una cantidad pesada de unos 25 gramos de grasa patrón licuada y mezclada, cerrar herméticamente las ampollas y agitarlas, la mitad (grupo 1) a 30°C y la otra mitad (grupo 2) a unos 50°C, cada una de ellas al menos durante una hora.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

La determinación de la liposolubilidad se debe efectuar a 37°C ± 0,5°C.

1.6.3. *Metodología*

Agitar el contenido de las ampollas de los dos grupos a 37°C ± 0,5°C hasta consiguir una mezcla perfecta.

En general, el tiempo de agitación necesario para establecer el equilibrio no se puede indicar por adelantado. En el caso de las sustancias líquidas, la saturación puede lograrse en unos minutos; en el caso de las sustancias sólidas, puede tardar horas. Normalmente, el tiempo de agitación no pasará de tres horas. Una vez transcurridas, se interrupirá la agitación de dos ampollas de cada uno de los dos grupos y se dejarán reposar al menos durante una hora a 37°C, a fin de separar la cantidad de sustancia no disuelta y permitir la formación de la fase homogénea. Si se produce una emulsión o una suspensión (por ejemplo, efecto Tyndall), eliminarla con un método apropiado, por ejemplo, centrifugación termostatizada.

Agitar la tercera y cuarta ampolla de los dos grupos, al menos durante 24 horas, y luego dejarlas reposar durante una hora a 37°C ± 0,5°C.

Nota:

Si transcurrido dicho periodo de tiempo no se deposita ningún sedimento (en el caso de las sustancias sólidas) o si no se produce ninguna separación de fase (en el de las sustancias líquidas) deberá repetirse el ensayo con una cantidad mayor de sustancia.

1.6.4. *Análisis*

Para efectuar el análisis se toma una muestra de cada fase de grasa saturada, se pesa y se determina la fracción disuelta.

Podrá utilizarse cualquier método analítico apropiado, bien directamente o bien previa extracción con agua, con un disolvente orgánico o mediante cualquier otra técnica de separación.

Ejemplos:

— espectrofotometrío,

— cromatografía en fase gaseosa o líquida,

— voltametría.

2. RESULTADOS

Si se observan diferencias sensibles en los resultados de la subsaturación o de la sobresaturación, o si el período de tiempo es excesivamente largo o breve, el ensayo deberá repetirse con tiempos de agitación más largos.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— descripción precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— descripción precisa de la grasa (por ejemplo: características, origen, composición),

— método de análisis, desviaciones y aspectos específicos.

Los resultados deben evaluarse tal como se describe más arriba y anotarse en el informe del ensayo. Si no se aprecia ninguna diferencia significativa entre los valores observados en miligramos por 100 gramos, se anotarán los valores individuales, el valor medio y la desviación estándar. Si se observan diferencias significativas, incluso después de una nueva prueba, sólo se consignarán los resultados individuales.

Se facilitarán todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 116 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

Apéndice

EJEMPLO DE GRASA PATRON

El cuadro siguiente muestra la composición de una grasa patrón

Distribución del ácido graso

Número de átomos C en la fracción «ácido graso»	6	8	10	12	14	16	18	otros
% (por medida superficial GPC)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Distribución de glicéridos

Número de átomos C en la fracción «ácido graso»	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
% (por medida superficial GCP)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2

Pureza

Contenido en monoglicéridos (enzimático)	≤ 0,1 %
Contenido en diglicéridos (enzimático)	≤ 0,4 %
Contenido no saponificable	≤ 0,1 %
Indice de Wijs	≤ 0,5 %
Indice de ácido	0,02 %
Grado de humedad (K. Fisher)	≤0,1 %
Punto de fusión clara	28,5Ø C

Espectro de absorción tipo (espesor de capa d = 1 cm, comparación: agua, 35°C

Longitud de onda (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Transmisión (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Al menos 10 % de transmisión de la luz a 303 nm.

Esta grasa es una mezcla sintética de triglicéridos saturados, con una distribución en un ácido graso y triglicéridos, semejante a la de un aceite de coco.

A.8. COEFICIENTE DE REPARTO

1. MÉTODO

El método descrito se basa en las líneas directrices de la OCDE (1).

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones preliminares sobre la constante de disociación, la hidrosolubilidad y la tensión superficial de la sustancia antes de proceder al ensayo.

El método sólo se aplica a sustancias esencialmente puras, solubles en el agua y en el n-octanol. No es aplicable a los tensioactivos.

1.2. Definiciones y unidades

El coeficiente de reparto (R) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio (c_i) de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes casi no miscibles. En el caso del n-octanol y del agua:

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{agua}}$$

El coeficiente de reparto es, pues, el cociente de dos concentraciones; se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal (log R).

1.3. Sustancias de referencia

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se analiza una nueva sustancia. Deben servir esencialmente para calibrar el método de vez en cuando y para comparar los resultados cuando se utilicen métodos distintos.

1.4. Principios del método

Para determinar un coeficiente de reparto, es conveniente conseguir un equilibrio entre el conjunto de 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 encuentran numerosas técnicas que pueden utilizarse 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.

1.5. Criterios cualitativos

1.5.1. *Repetibilidad*

Para obtener un coeficiente de reparto preciso, se procederá a 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 de dicho coeficiente, deberán situarse en un intervalo de $\pm 0{,}3$ unidad log.

1.5.2. *Sensibilidad*

El intervalo de medida del método está determinado por el limite de detección del procedimiento analitico. Esto debe ser suficiente para estimar los valores de R_{ow} hasta 10^5, cuando la concentración de la solución en cada fase no sobrepase los 0,01 mol por litro.

1.5.3. *Especificidad*

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 varias disoluciones diferentes.

La disociación o la asociación o la asociación de moléculas disueltas se traduce por desviaciones respecto a la ley de reparto citada. Estas desviaciones se explican porque el coeficiente de reparto depende entonces de la concentración de la solución.

Debido a los múltiples equilibrios presentes, este método de ensayo no debe aplicarse sin corregir los compuestos ionizables. (Para estos compuestos debe considerarse la utilización de soluciones tampón en lugar de agua.)

1.6. **Descripción del método**

1.6.1. *Estimación preliminar del coeficiente de reparto*

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse bien por un simple cálculo (2), o bien utilizando las solubilidades de la sustancia de ensayo en los disolventes puros (1).

Para ello,

$$P_{\text{estimación}} = \frac{\text{saturación } C_{\text{n-octanol}}}{\text{saturación } C_{\text{agua}}}$$

Se puede proceder igualmente a una determinación *grosso modo* mediante un ensayo preliminar simplificado.

1.6.2. *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.

Nota

Evitar el agua extraida directamente de un intercambiador de iones.

1.6.2.1. Presaturación de los disolventes

Antes de determinar un coeficiente de reparto, se saturan recíprocamente las fases del sistema de disolventes agitando a la temperatura de ensayo. Para realizar esto, es práctico 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, dejándolos luego reposar hasta que se separen las fases y se alcance el estado de saturación.

1.6.2.2. Preparación para el ensayo

El volumen liquido debe llenar casi completamente el recipiente de ensayo para evitar cualquier pérdita de materia debida a la volatilización. La relación de volumen y las cantidades de sustancia que deben utilizarse se determinan de la siguiente forma:

— estimación preliminar del coeficiente de disolución (ver a continuación),

— cantidad mínima de sustancia de ensayo requerida para el procedimiento analítico utilizado,

— límite de concentración máxima en cada fase de 0,01 mol por litro.

Se efectuarán tres ensayos. En el primero, se añade el volumen calculado, en el segundo, dos veces el volumen de n-octanol y, en el tercero, la mitad del volumen de n-octanol.

1.6.2.3. Sustancia de ensayo

Para asegurar el equilibrio durante el ensayo, se prepara una solución de reserva en n-octanol con una concentración en masa comprendida entre 1 y 100 miligramos por mililitro. La concentración en masa real de esta solución de reserva debe determinarse con precisión antes de utilizarla para determinar el coeficiente de reparto. Esta solución deberá guardarse en condiciones estables.

1.6.3. *Condiciones de ensayo*

La temperatura de ensayo debe mantenerse constante (± 1°C) y situarse en el intervalo de 20°C a 25°C.

1.6.4. *Procedimiento de medida*

1.6.4.1. 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, asi como la cantidad necesaria de solución de reserva.

Medir los volúmenes de octanol. Colocar en un agitador apropiado o agitar a mano los recipientes de ensayo. Un méthodo que se recomienda consiste en hacer girar rápidamente 180 grados el tubo que hay que centrifugar alrededor de su eje transversal, de forma que el aire que pudiera haber quedado retenido atraviese las dos fases.

1.6.4.2. Separación de las fases

Para separar las fases centrifugar la mezcla. Efectuar esta operación con una centrifugadora de laboratorio mantenida a temperatura ambiente o, si se utiliza una centrifugadora sin control de temperatura, reequilibrar los tubos centrifugadores a la temperatura de ensayo por lo menos una hora antes del análisis.

1.6.5. *Análisis*

Para determinar el coeficiente de reparto, es necesario analizar las concentraciones de la sustancia de ensayo en las dos fases. Para ello, 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 de sustancia presente en las dos fases y compararla con la cantidad que se introdujo inicialmente.

La fase acuosa debe prepararse por un procedimiento que reduzca al mínimo el riesgo de incorporar trazas de octanol: para ello se puede utilizar una jeringuilla de cristal con aguja intercambiable; en primer lugar llenar parcialmente de aire la jeringuilla y a continuación expulsarlo lentamente introduciendo al mismo tiempo la aguja en 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 a la sustancia. Algunos métodos idóneos de determinación fisicoquímica pueden ser:

— métodos fotométricos,

— cromatografía en fase gaseosa,

— cromatografía en fase líquida a alta presión.

2. RESULTADOS

Si P_{ow} medido es superior a 10^4, se recomienda comparar los resultados con un valor P_{ow} calculado, obtenido, por ejemplo, según el método indicado en la referencia 3.

La fiabilidad de los valores determinados de P puede verificarse procediendo a una comparación de la media de las determinaciones efectuadas por duplicado, con la media general.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— descripción precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— temperatura a la que se ha efectuado la medida,

— procedimiento analítico utilizado para determinar las concentraciones,

— concentraciones medidas en las dos fases, para cada determinación (consignar, por lo tanto, un total de 12 concentraciones),

— peso de la sustancia de ensayo, volumen de cada fase utilizada en cada recipiente, cantidad total calculada de sustancia de ensayo presente en cada fase después de equilibrar,

— para cada serie de condiciones de ensayo y por el mismo concepto que para la media del conjunto de medidas, los valores calculados del coeficiente de reparto (P) y el valor medio. Debe mencionarse si se ha advertido alguna dependencia de la concentración con respecto al coeficiente de reparto,

— la desviación tipo de los valores individuales de P en relación a su media,

— media P del conjunto de las determinaciones expresada por su logaritmo decimal,

— P_{ow} teórico calculado cuando este valor ha sido determinado o cuando el valor medido es $>10^4$,

— pH del agua utilizada y de la fase acuosa durante el ensayo,

— todas las observaciones e informaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, Paris 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 Final

(2) OCDE, Paris 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 Final

(3) OCDE, Paris 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 Final.

A.9. PUNTO DE INFLAMACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones preliminares sobre la inflamabilidad de la sustancia antes de proceder al ensayo. Este método es aplicable a las sustancias líquidas, en su forma comercial, 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 métodos individuales.

1.2. Definiciones y unidades

El punto de inflamación es la temperatura, corregida por una presión de 101,325 kPa, a la cual el líquido de ensayo desprende vapores en un recipiente cerrado, en las condiciones definidas en el método de ensayo y en unas cantidades que produzcan una mezcla vapor/aire inflamable en dicho recipiente.

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 examinan nuevas sustancias. Su principal función es la de servir para calibrar periódicamente el método y comparar los resultados cuando se aplique otro método distinto.

1.5. Criterios cualitativos

1.5.1. *Reproducibilidad*

La reproducibilidad 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 de ensayo en un aparato de ensayo, de conformidad con los puntos 1.6.3.1 y/o 1.6.3.2.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

Es preferible instalar el aparato lejos de corrientes de aire.

1.6.3. *Desarrollo del ensayo*

1.6.3.1. Método del equilibrio

Ver normas ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. Método del no equilibrio

Aparato Abel:

Ver normas BS 2000, parte 170, NF M07-011 y NF T66-009

Aparato Abel-Pensky:

Ver 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:

Ver normas ASTM D-56 e ISO 2719.

Aparato Pensky-Martens:

Ver normas ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 200-34 y NF M07-019.

Observaciones:

Cuando el punto de inflamación deterinado por un método basado en el no equilibrio (ver punto 1.6.3.2) tiene los siguientes valores: 0 ± 2°C, 21 ± 2°C, 55 ± 2°C, es conveniente confirmalo mediante un método basado en el equilibrio y utilizando el mismo aparato.

Unicamente 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. Ver normas ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 y DIN 53213, parte primera.

2. **RESULTADOS**

3. **INFORME**

Se procurará incluir lo siguiente:

— descripción precisa de la sustancia,

— descripción del método utilizado,

— 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 informaciones preliminares sobre las propiedades explosivas potenciales de la sustancia antes de proceder al ensayo.

El presente método sólo es aplicable a las sustancias en polvo, granuladas o pastosas.

Para no englobar todas las sustancias que pueden inflamarse, sino únicamente aquellas que se queman muy rápidamente o cuya combustión es, de una forma u otra, particularmente peligrosa, sólo se consideran como muy inflamables las sustancias cuya velocidad de combustión sobrepase un cierto límite. Por otra parte, se considerarán igualmente muy inflamables los polvos metálicos capaces de consumirse si la incandescencia se propaga a toda la muestra; dicha incandescencia y las dificultades relacionadas con la extinción del fuego constituyen la razón principal por la que los mismos son especialmente peligrosos. Los agentes de extención habituales como el dióxido de carbono y/o el agua pueden incrementar considerablemente el peligro.

1.2. Definición y unidades

Tiempo de combustión expresado en segundos.

1.3. Sustancias de referencia

No se especifican.

1.4. Principio del método

Se prepara la sustancia, en su forma comercial, en pilas de 250 milímetros de longitud. Se intenta, a continuación, inflamar la muestra en las condiciones definidas en el punto 1.6.3. y se mide el tiempo de combustión.

1.5. Criterios cualitativos

No se indican.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparación*

En el caso de sustancias en polvo o granuladas, se vierte la sustancia, en su forma comercial, dentro de un molde metálico de 250 milímetros de longitud y cuya sección transversal triangular mida 10 y 20 milímetros de alto y ancho, respectivamente. A ambos lados del molde, en sentido longitudinal, se colocan dos ángulos metálicos a modo de soportes laterales. Dichos ángulos deben sobrepasar en 2 milímetros el borde superior de la sección triangular transversal del molde (ver figura). A continuación se deja caer varias veces el molde desde una altura de 2 centímetros sobre una superficie dura. Si fuera necesario se añade sustancia. A continuación, se retiran los ángulos laterales y se enrasa. Se coloca el molde sobre una placa no combustible y no porosa, si le da la vuelta y se desmolda.

Extender las sustancias postosas sobre una superficie no combustible formando un cordón de 250 milímetros de longitud y alrededor de 1 centímetro cuadrado de sección.

Utilizando una fuente de ignición adecuada, por ejemplo, una llama pequeña o un hilo calentado al menos a 1 000°C, inflamar la pila por uno de sus extremos.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

En el caso de sustancias sensibles a la humedad efectuar el ensayo lo más ràpidamente posible después de retirar la sustancia de su recipiente.

1.6.3. *Desarrollo del ensayo*

Inflamar uno de los extremos de la pila. Cuando la pila haya ardido hasta unos 80 milímetros, medir la velocidad de combustión en los 100 milímetros siguientes. Efectuar el ensayo seis veces seguidas utilizando cada vez una placa distinta y fria.

2. RESULTADOS

Para proceder a la evaluación es preciso disponer de los valores de tiempo de combustión comprobados durante seis ensayos.

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— la descripción precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— una descripción de la sustancia de ensayo, su estado físico, incluida la tasa de humedad,

— los resultados de las medidas,

— cualquier observación complementaria que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

3.2. **Interpretación de los resultados**

Las sustancias pulverulentas, granuladas o pastosas se deberán considerar fácilmente inflamables cuando el tiempo de combustión durante los seis ensayos efectuados según el procedimiento descrito en 1.6 sera inferior a 45 segundos. Deberá considerarse que los polvos metálicos o de aleaciones metálicas son fácilmente inflamables cuando pueden ser inflamados y la llama o la zona de reacción se extiende a toda la muestra.

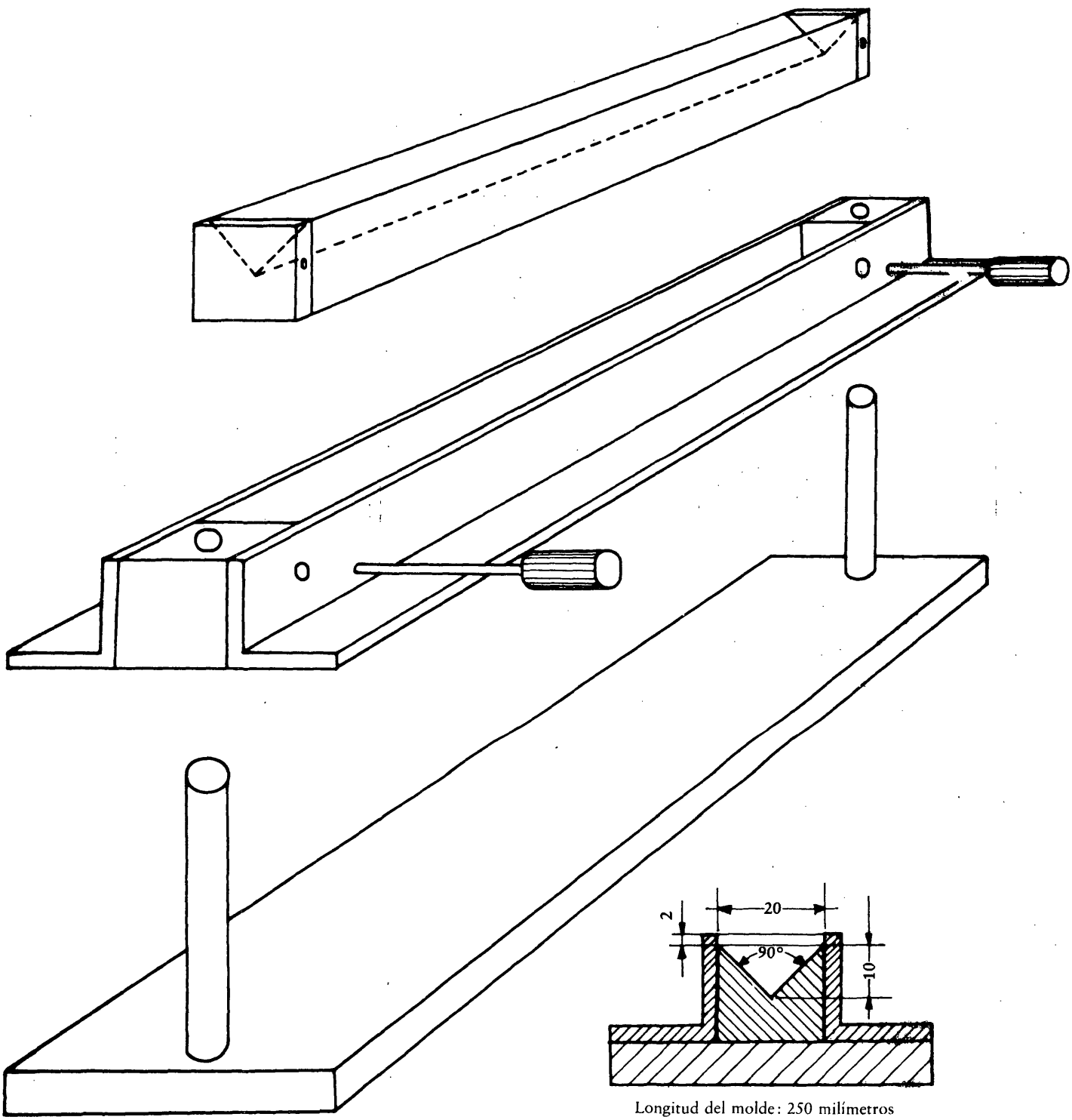
4. BIBLIOGRAFÍA

Ninguna.

Apéndice

Figura

Molde y accesorios necesarios para la formación de las pilas
(todas las dimensiones expresadas en milímetros)



Longitud del molde: 250 milímetros
Material: aluminio

A.11. INFLAMABILIDAD (GAS)

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El presente método permite determinar si gases mezclados con el aire a temperatura y presión ambientes presentan un intervalo de inflamabilidad. Se exponen mezclas que contengan concentraciones crecientes de gas de ensayo, a una chispa eléctrica 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 las concentraciones en el aire de gas inflamable a las 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 cualitativos

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 milímetros y una altura de 300 milímetros, como mínimo, que se dispone verticalmente. Los electrodos de ignición distan de 3 a 5 milímetros uno del otro y están situados a 60 milímetros del fondo del cilindro. El cilindro está equipado con una válvula. El aparato debe estar protegido por un blindaje para limitar los daños de una posible explosión.

La fuente de ignición es una chispa inductiva alimentada durante un periodo de 0,5 segundos, producida por un transformador de alta tensión con una tensión de salida de 10 a 15 kV (la potencia máxima es de 300 W).

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

El ensayo debe efectuarse a temperatura ambiente.

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. Hacer saltar una chispa en esta mezcla y observar 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.

2. RESULTADOS

La propagación de la llama constituye el único dato de información válido para la determinación de esta propiedad.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— la descripción precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— una descripción del aparato utilizado, mencionando las dimensiones,

— la temperatura ambiente en el momento del ensayo,

— las concentraciones de ensayo asi como los resultados obtenidos,

— los resultados del ensayo: gas no inflamable o fácilmente inflamable,

— si se ha llegado a la conclusión de que no es inflamable, se debe especificar claramente que se han probado todas las concentraciones, aumentando cada vez la concentración en un 1 %, desde 0 a 100 %,

— cualquier información u observación que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

Ninguna.

A. 12. INFLAMABILIDAD (SUSTANCIAS Y PREPARADOS QUE, EN CONTACTO CON EL AGUA O CON EL AIRE HÚMEDO, DESPRENDEN GASES FÁCILMENTE INFLAMABLES EN CANTIDADES PELIGROSAS)

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Este método de ensayo puede utilizarse para determinar si la reacción de una sustancia con el agua ocasiona el desprendimiento de una cantidad peligrosa de un gas o de varios gases, que pueden ser fácilmente inflamables o tóxicos.

Puede aplicarse tanto a sustancias sólidas como líquidas, pero no a las sustancias que se inflaman espontáneamente en contacto con el aire.

1.2. Definición y unidades

Fácilmente inflamables:

Sustancias y preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, desprenden una cantidad peligrosa de gases fácilmente inflamables, a una velocidad de, como minimo, 1 l/kg h Este limite no tiene en cuenta la toxicidad del gas.

1.3. Principio del método

El ensayo incluye varias fases que se describen a continuación; si la inflamación se produce en cualquiera de estas fases no es necesario proseguir el ensayo.

1.3.1. *Fase 1*

Colocar la sustancia de ensayo en una cubeta que contenga agua destilada a 20°C y observar si el gas desprendido se inflama o no.

1.3.2. *Fase 2*

Colocar la sustancia de ensayo en un papel filtro que flote en un recipiente lleno de agua destilada a 20°C y observar si el gas que se desprende se inflama o no. El papel filtro sólo sirve para mantener la sustancia en su lugar, lo cual aumenta las probabilidades de inflamación.

1.3.3. *Fase 3*

Formar con la sustancia de ensayo pilas de 2 centímetros de altura y 3 centímetros de diámetro, aproximadamente. Añadir algunas gotas de agua a la pila y observar si el gas que se desprende se inflama o no.

1.3.4. *Fase 4*

Mezclar la sustancia de ensayo con agua destilada a 20°C y medir el caudal de gas durante 7 horas, a intervalos de una hora. Si, al cabo de 7 horas, el caudal es variable o aumenta, debe prolongarse el tiempo de medida hasta un máximo de 5 dias. Si, a un momento dado, el caudal supera 1 l/kg h, el ensayo puede darse por acabado.

1.4. **Sustancia de referencia**

No se especifica.

1.5. **Criterios cualitativos**

No se indican.

1.6. **Descripción de los métodos**

1.6.1. *Fase 1*

1.6.1.1. Condiciones del ensayo

La sustancia de ensayo se utiliza en su forma comercial y el ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20°C).

1.6.1.2. Desarrollo del ensayo

Colocar una pequeña cantidad (aproximadamente unos 2 milímetros de diámetro) de la sustancia de ensayo 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 filtro flotando sobre la superficie de agua destilada en un recipiente adecuado, por ejemplo, una cubeta de 100 milímetros de diámetro.

1.6.2.2. Condiciones del ensayo

La sustancia de ensayo se utiliza en su forma comercial y el ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20°C).

1.6.2.3. Desarrollo del ensayo

Colocar una pequeña cantidad de la sustancia de ensayo (aproximadamente 2 milímetros de diámetro) en 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

La sustancia de ensayo se utiliza en su forma comercial y el ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20°C).

1.6.3.2. Desarrollo del ensayo

Formar con la sustancia de ensayo pilas de 2 centímetros de altura y 3 centímetros de diámetro, aproximadamente, con un pequeño cráter en la cumbre. Añadir algunas gotas de agua en el hueco y observar: 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

(Ver figura en el apéndice).

1.6.4.2. Condiciones del ensayo

Asegurarse de que el recipiente que contiene la sustancia de ensayo está libre de partículas pulverulentas (< 500 µm). Si éstas representan más del 1 % en peso del total, o si la muestra es quebradiza, reducir a polvo la sustancia antes de proceder al ensayo, con el fin de reducir la dimensión de las partículas durante el almacenamiento; sino, la sustancia se utiliza en su forma comercial. Realizar el ensayo a temperatura ambiente (20°C) y a presión atmosférica.

1.6.4.3. Desarrollo del ensayo

Verter agua en el embudo con llave, después, extraer, pesar y colocar en un matraz cónico una cantidad suficiente de sustancia, hasta un peso máximo de 25 gramos, a fin de obtener un desprendimiento de gas entre 100 y 250 centímetros cúbicos. Medir por cualquier medio que sea apropiado el volumen de gas desprendido. Abrir la llave del embudo para dejar pasar el agua al matraz; poner en marcha un cronómetro. Registrar el tiempo que es necesario para que el gas se desprenda totalmente y, si es posible, proceder a lecturas intermedias. El ensayo debe repetirse tres veces.

Si no se conoce la identidad química del gas, debe analizarse. Si el gas contiene componentes fácilmente inflamables y si, además, se ignora si el conjunto de la mezcla es fácilmente inflamable, preparar y probar una mezcla de la misma composición de conformidad con el método (A. 11).

2. RESULTADOS

Para que una sustancia de ensayo pueda considerarse peligrosa, es suficiente que se haya observado una inflamación, o un desprendimiento de gas fácilmente inflamable a una velocidad superior a 1 l/kg h en al menos tres ensayos.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— indicación y descripción precisa de la sustancia, tal y como se ha recibido (por ejemplo, color, dimensión de las partículas y estado físico),

— cualquier preparación inicial de la sustancia de ensayo,

— resultados de los ensayos,

— identidad química del gas desprendido,

— la velocidad de formación del gas (1.6.4),

— cualquier observación complementaria que sea útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

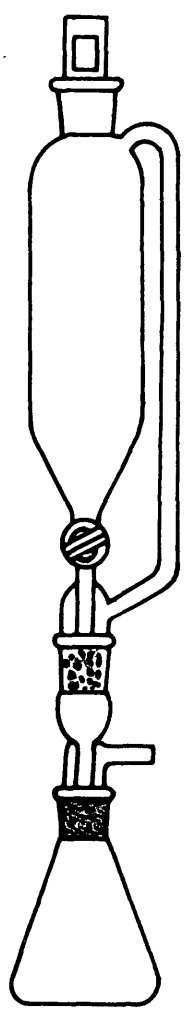
(1) ISO 1773

(2) OCDE Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give of Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water. A 80/82-Final report of the OECD chemical testing programme.

(3) UN doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1

Apéndice

Figura
Equipo



A. 13 INFLAMABILIDAD (SÓLIDOS Y LÍQUIDOS)

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones preliminares sobre la autoinflamabilidad de las sustancias. El procedimiento del ensayo es aplicable a las sustancias sólidas y líquidas comercializadas que, en pequeñas cantidades, pueden inflamarse espontáneamente poco tiempo después de haber entrado en contacto con el aire a temperatura ambiente.

Este método de ensayo no puede aplicarse a las sustancias que se inflaman espontáneamente al cabo de varias horas o días a temperatura ambiente, ni a las sustancias que sólo se inflaman espontáneamente después de estar expuestas a una temperatura considerablemente más elevada.

1.2. Definiciones y unidades

Se consideran fácilmente inflamables los líquidos y los sólidos que se inflaman espontáneamente por lo menos una vez a lo largo de los seis ensayos efectuados en las condiciones descritas en el punto 1.6.

Para determinar la autoinflamabilidad de los líquidos puede ser necesario efectuar un ensayo según el método citado en la parte A. 15 (autoinflamabilidad: determinación de la temperatura de autoinflamabilidad de los líquidos y gases volátiles).

1.3 Sustancias de referencia

No se especifican.

1.4. Principio del método

La sustancia se pone en contacto con el aire a una temperatura de 25 ± 10°C durante 5 minutos. Si se produce la inflamación, se considerará que la sustancia es fácilmente inflamable.

1.5. Criterios cualtitavivos

Repetibilidad: debido a la importancia que tienen los aspectos de seguridad, un sólo resultado positivo en los seis ensayos será suficiente para considerar la sustancia como altamente inflamable.

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. *Equipo*

LLenar una cubeta de porcelana de unos 10 centímetros de diámetro con una capa de tierra de infusorios, de unos 5 milímetros de espesor, a temperatura ambiente.

Oberservación:

La tierra de infusorios, o cualquier otra sustancia inerte equivalente que se obtenga fácilmente, se tomará como reprensentativa del suelo sobre el que pudiera esparcirse accidentalmente la sustancia.

1.6.2. *Realización del ensayo*

a) Sólidos pulverulentos

Verter 1 o 2 centímetros cúbicos de la sustancia de ensayo, desde una altura de alrededor de 1 metro, sobre una superficie no combustible y observar si la sustancia se inflama durante la caída o durante los primeros cinco minutos después de depositarse.

b) Líquidos

Verter unos cinco centímetros cúbicos del líquido de ensayo en una cubeta de porcelana preparada y observar si la sustancia se inflama en un tiempo de cinco minutos.

2. **RESULTADOS**

Son necesarios los resultados de los seis ensayos para la evaluación.

3. **INFORME**

Se procurará incluir lo siguiente:

— descripción de la sustancia de ensayo,

— resultados del ensayo.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE Paris, *Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solides and Liquids*. A 80/25-Final report of the OECD chemical testing programme.

A.14. PROPIEDADES EXPLOSIVAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Se trata de un método de ensayo que permite determinar si una sustancia o preparado sólidos, líquidos o pastosos presentan o no peligro de explosión cuando están expuestos al efecto de una llama (sensibilidad térmica), a un choque o a una fricción (sensibilidad a estímulos mecánicos).

El método comprende tres partes:

a) un ensayo de sensibilidad térmica;

b) un ensayo de sensibilidad mecánica (choque);

c) un ensayo de sensibilidad mecánica (fricción).

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 o un preparado pueden o no hacer explosión en ciertas condiciones o en qué medida puede propagarse la descomposición inicial y provocar la explosión de toda la muestra.

Sirve para determinar si una sustancia o un preparado presentan un peligro de explosión (sensibilidad térmica y mecánica) en las condiciones específicas definidas por la Directiva. Los ensayos no tienen objeto si los datos termodinámicos disponibles (calor de formación, calor de descomposición, ausencia de grupos reactivos (1) en la fórmula desarrollada) permiten establecer de forma razonablemente inequívoca que la sustancia o el preparado no son susceptibles de descomponerse, formar gases y propagar calor muy rápidamente (dicho de otro modo, si la materia no presenta ningún riesgo de explosión). No obstante, el método no debe considerarse definitivo. En el ensayo se utiliza un cierto número de equipos específicos seleccionados, ampliamente utilizados a nivel internacional y que, por regla general, dan resultados convincentes.

Quien realice el experimento podrá elegir otro tipo de equipo para los tres métodos ya citados, a condición de que dicha elección sea justificada en el plano científico y que el equipo esté reconocido internacionalmente. En tal caso, deberá determinar la correlación de sus resultados con los resultados obtenidos con el equipo que aquí se especifica.

1.2. Definiciones y unidades

Sustancias y preparados explosivos:

Las sustancias y preparados que puedan hacer explosión bajo el efecto de una llama, o que sean más sensibles al choque o a la fricción que el dinitrobenceno.

1.3. Sustancia de referencia

Meta-dinibrobenceno, producto técnico cristalizado, para el método de ensayo por fricción o por choque.

1.4. Principio del método

Se debe realizar un ensayo preliminar de selección para determinar las condiciones de seguridad que deben presidir la ejecución de los tres ensayos de sensibilidad.

1.4.1. *Prueba preliminar de selección*

Se someten muestras muy reducidas (unos 10 mg) de sustancia o de preparado a un calentamiento sin confinamiento en una llama de un mechero Bunsen, a un 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 descritos deban realizarse con toda clase de precauciones a fin de evitar cualquier daño corporal a quien realice el experimento.

1.4.2. *Sensibilidad térmica*

Este método consiste en calentar la sustancia o el preparado en un tubo de acero a diferentes grados de confinamiento que se consiguen mediante placas de ventilación con agujeros de diferentes diámetros, para determinar si la sustancia o el preparado pueden hacer explosión a causa de una presión térmica.

1.4.3. *Sensibilidad mecánica (choque)*

El método consiste en someter la sustancia o el preparado a un choque golpeando con un martillo sobre un yunque de acero.

1.4.4. *Sensibilidad mecánica (fricción)*

Este método consiste en someter la sustancia o el preparado a una fricción entre dos superficies tipo, en condiciones específicas de carga y de movimiento relativo.

1.5. **Criterios cualitativos**

No se indican.

1.6. **Descripción del método**

1.6.1. *Equipo*

1.6.1.1. Sensibilidad térmica (efecto de la llama)

El tubo de acero se fabrica con chapa maleable (ver Apéndice) mediante un proceso de laminado. Su diámetro interior es de 24 milímetros, su longitud de 75 milímetros y el espesor de la pared es de 0,5 milímetros. El extremo abierto del tubo está provisto de una abrazadera de cierre (ver figura 1). Está provisto además de una placa quemadora circular resistente a la presión y con un respiradero. Esta placa está sólidamente sujeta al tubo por una junta aterrajada en dos partes (tuerca macho y hembra). La placa (ver figura 1) tiene un espesor de 6 milímetros y está fabricada con un acero al cromo altamente resistente (ver Apéndice).

Quien realice el experimento tiene a su disposición una serie de placas quemadoras con respiraderos de varios diámetros (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 mm) para determinar el grado de riesgo de explosión que presenta la sustancia y el preparado. Las tuercas macho y hembra (ver figura 1) son de acero al cloromanganeso (ver Apéndice) y no producen chispas hasta los 800°C. Los tubos de acero sólo se pueden utilizar para una experiencia.

1.6.1.2. Sensibilidad mecánica (choque)

El equipo clásico de martinete comprende, esencialmente: un bloque de hierro colado (hierro gris), un hombro de espiga y un yunque, una columna, dos guías, una masa que cae y un mecanismo de liberación. El bloque de acero (longitud 230 mm × anchura 250 mm × altura 200 mm) con un hombro de espiga colado (longitud 450 mm × anchura 450 mm × altura 60 mm) sostiene el yunque de acero de 100 milímetros de diámetro y 70 milímetros de altura, sobre el cual está atornillado. El soporte está atornillado al dorso del bloque y en este mismo soporte se fija la columna que consiste en un tubo de acero laminado sin soldadura de 90 milímetros de diámetro exterior y de 70 milímetros de diámetro

interior. Cuatro tornillos fijados en un bloque de hormigón de 60 × 60 × 60 centímetros mantienen el martinete de forma que los rieles estén absolutamente verticales y permitan un deslizamiento fácil. El martinete, con un peso de 10 kilogramos, es de acero templado; debe tener una superficie de impacto de acero tratado HRC 60-63 y un diámetro mínimo de 25 milímetros. Durante los ensayos la altura de caída es de 0,4 metros.

La muestra de ensayo se coloca en una matriz consistente en dos cilindros coaxiales de acero templado, colocados uno encima del otro y un cilindro hueco de acero que sirve de guía. Los cilindros coaxiales deben tener un diámetro de 10 (−0,003 −0,005) milímetros, una altura de 10 milímetros, superficies pulidas y aristas redondeadas (radio de curvatura 0,5 mm), dureza: HRC 58 a 65. El cilindro hueco tendrá un diámetro exterior de 16 milímetros, un calibre de 10(+0,005 +0,010) milímetros, la cara interna pulida y una altura de 13 milímetros. Si se produce la explosión, los cilindros de acero y el cilindro hueco no deben volver a utilizarse para otros ensayos. La matriz se coloca sobre un yunque intermedio de acero de 26 milímetros de altura que se centra mediante un anillo de centrado provisto de anillo de ajuste con el fin de eliminar los gases causados por la explosión.

1.6.1.3. Sensibilidad mecánica (fricción)

El equipo para el ensayo de fricción consiste en una bandeja de hierro colado (hierro gris) sobre la cual se monta el dispositivo de fricción propiamente dicho, consiste en una espiga fija de porcelana y varios platos de procelana móviles. El plato de porcelana se fija a una corredera que se desplaza sobre dos rieles. La corredera se acciona por medio de una barra de arrastre, una polea excéntrica y un engranaje de trasmisión, con motor eléctrico, de manera que el plato se desplace sobre una distancia de 10 milímetros hacia atrás y hacia delante por debajo de la barra de arrastre. La espiga se carga a 360 newtons.

Los platos son de porcelana técnica blanca y tienen las siguientes dimensiones: 25 milímetros de longitud × 25 milímetros de anchura × 5 milímetros de espesor. Las dos caras de fricción de los platos se hacen más rugosas (profundidad bruta 9 a 32 µm) antes del calentamiento, frotando con una esponja.

La espiga cilíndrica es también de porcelana blanca técnica, de 15 milímetros de longitud, 10 milímetros de diámetro, y con extremos curvos y rugosos (radio de curvatura 10 mm).

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

1.6.2.1. Sensibilidad térmica (efecto de la llama)

Colocar la sustancia de ensayo, tal y como se comercializa, en el tubo hasta alcanzar una altura de 60 milímetros, efectuando el llenado en tres tiempos y con cantidades iguales. Comprimir suavemente, cada vez, aplicando una fuerza de 80 newtons sobre la superficie con un pistón de madera apropiado de un diámetro ligeramente inferior al del tubo. Si la sustancia es gelatinosa, evitar la formación de burbujas de aire mientras se efectúa el llenado.

1.6.2.2. Sensibilidad mecánica (choque)

Proceder al ensayo con la sustancia en estado seco. La muestra debe tener un volumen de 40 milímetros cúbicos, un otro compatible con el equipo indicado. En cuanto a las sustancias sólidas, excepto las sustancias pastosas, proceder de la siguiente forma:

a) tamizar las sustancias pulverulentas (malla de 0,5 mm); la fracción tamizada se utiliza para el ensayo;

b) disgregar y tamizar las sustancias comprimidas, fundidas o condensadas; la fracción tamizada (diámetro de 0,5 a 1 mm) se utiliza para el ensayo.

En cuanto a las sustancias líquidas, empujar hacia abajo el cilindro metálico superior hasta colocarlo a 1 milímetro del cilindro inferior y mantenerlo en esta posición.

1.6.2.3. Sensibilidad mecánica (fricción)

Proceder al ensayo con la sustancia en estado seco. La muestra debe tener un volumen de 10 milímetros cúbicos. En cuanto a las sustancias sólidas, excepto las sustancias pastosas, proceder de la siguiente forma:

a) tamizar las sustancias pulverulentas (malla de 0,5 mm); la fracción tamizada se utiliza para el ensayo;

b) disgregar y tamizar las sustancias comprimidas, fundidas o condensadas; la fracción tamizada (diámetro inferior a 0,5 mm) se utiliza para el ensayo.

1.6.3. *Desarrollo de los ensayos*

1.6.3.1. Sensibilidad térmica (efecto de la llama)

Se calienta por medio de propano procedente de una botella de gas comprimido industrial, equipada con un manómetro (500 mbar) y un contador y distribuyéndo mediante un colector con cuatro quemadores. Los cuatro quemadores consumen 3,2 litros de propano por minuto. Si se utilizan otros gases para calentar, los quemadores, el consumo de gas y la entrada de aire deberán ser los apropiados para que las medidas efectuadas con sustancias inertes (arena, ftalato de dibutilo) registren subidas de temperatura similares a las obtenidas con el propano en los tubos llenos.

Los quemadores se sitúan alrededor de la cámara de ensayo, tal como se indica en la figura 2.

Ajustar los quemadores de forma que la punta del cono azul interno de la llama toque casi el tubo. El ensayo se efectuará en una cámara metálica cuyas dimensiones se indican en la página 2.

Las dimensiones de los quemadores de propano se indican en las figuras 3a y 3b.

Son obligatorias dos series de tres ensayos cada una, utilizando en la primera serie una placa quemadora con un orificio de 2 milímetros de diámetro y, en la segunda, un orificio de un diámetro superior a 2 milímetros (por ejemplo 6 mm).

Si la explosión se produce durante la primera serie (orificio 2 mm) no es necesario proceder a más ensayos. Si la explosión no se ha producido al cabo de 5 minutos, se dará por finalizado el ensayo.

1.6.3.2. Sensibilidad mecánica (choque)

Se realizarán seis ensayos en el aparato de choque que se ha indicado, haciendo caer la masa de 10 kilogramos desde una altura de 0,4 metros. En otros aparatos se compara la muestra con el m-dinitrobenceno, según el procedimiento que se establezca (técnica «up-and-down», etc.)

1.6.3.3. Sensibilidad mecánica (fricción)

Colocar la espiga de porcelana sobre la muestra de ensayo y colgar el peso. Al realizar el ensayo, las marcas dejadas por la esponja sobre el plato de porcelana deben ser transversales respecto a la dirección del movimiento. Comprobar que la espiga reposa sobre la muestra, que la cantidad de sustancia sometida a ensayo sea suficiente y que el plato se deslice correctamente sobre la espiga, es decir, que realice un movimiento de vaivén sobre una distancia de 10 milímetros en cada dirección y en 0,44 segundos. Utilizar cada parte de la superficie del plato únicamente para un ensayo.

2. RESULTADOS

2.1. Interpretación de los resultados

Los ensayos pueden interrumpirse en cuanto se obtenga un resultado positivo en uno de ellos.

2.2. Evaluación

En principio, se considera que una sustancia o un preparado presentan un peligro de explosión en el sentido de la Directiva si:

a) se produce una explosión (es decir, si el tubo estalla en tres o más pedazos) dentro del número fijado de ensayos de sensibilidad térmica,

o si,

b) se produce una explosión (la inflamación equivale a una explosión), por lo menos una vez, durante los seis ensayos realizados con el aparato de choque indicado, o si la muestra es más sensible que el m-dinitrobenceno al realizar otro ensayo por choque distinto,

o si,

c) se produce una explosión (la deflagración o la inflamación equivalen a una explosión), por lo menos una vez, durante los seis ensayos realizados con el aparato de fricción indicado, o si la muestra es más sensible que el 1,3-dinitrobenceno al realizar otro ensayo por fricción distinto.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

se procurará incluir lo siguiente:

— identidad, composición, pureza, grado higrométrico, etc., de la sustancia o preparado que se somete a ensayo,

— forma física de la muestra; precisar si ha sido tamizada o no,

— observaciones durante los ensayos (tipo de reacción, chispas, llama, explosión, número de fragmentos, etc.),

— resultados de cada ensayo,

— si se ha utilizado otro aparato, indicar las justificaciones científicas de dicha utilización, así como las pruebas de correlación entre los resultados obtenidos con el aparato prescrito y los obtenidos con aparatos equivalentes,

— cualquier observación que se considere útil, por ejemplo, referencia a ensayos realizados con productos similares, que puedan ser significativos para una interpretación correcta de los resultados.

3.2. Interpretación y evaluación de los resultados

El informe debe tener en cuenta 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.

A veces el resultado puede estar falseado debido a la forma física o a la naturaleza volátil de la sustancia o del preparado durante el ensayo; en tal caso, es conveniente conocer el resultado que se obtendría si la sustancia o el preparado se utilizaran en su forma comercial. Para ello se puede proceder a ensayos distintos. Si, finalmente, un resultado anormal no pudiera explicarse con otros métodos, se deberá aceptar como efectivo y utilizarlo para clasificar la sustancia o preparado en consecuencia.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) Bretherick, l., Handbook of Reactive Chemical Hazards, London. Butterworths, 1979, pp. 60-63.

(2) Koenen, H., Ide, K. H., Uber die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, Vol. 3, 1955, pp. 57-65, pp. 89-93.

(3) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Emplindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Offnungen (Stahlhusenverfahren), Explosive Stoffe, Vol. 4, 1956, pp. 119-125, 143-148.

(4) Koenen, H., Ide, K. H., Haupt, W., Über die prüfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinoser Beschaffenheit, Explosive Stoffe, Vol. 6, 1958, pp. 178-189, 202-214, 223-235.

(5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (document ST/SG/AC.10/5/Add.3, Table 4.3).

Apéndice

Ejemplo de especificación de equipo

(1) Especificación nº 1.0336.505 g, de conformidad con DIN 1623, hoja 1

(2) Especificación nº 1.4873, de conformidad con la hoja «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490-52.

(3) Especificación nº 1.3817, de conformidad con la hoja «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490-52.

Figura 1

(dimensiones en milímetros)

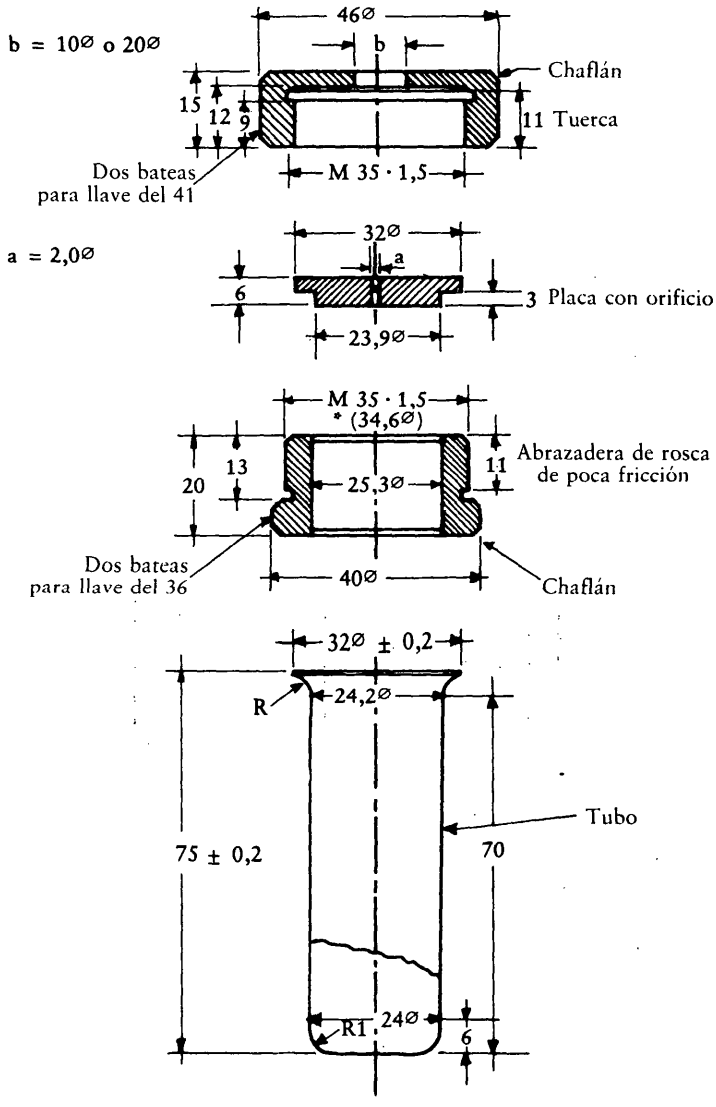


Figura 2

(dimensiones en milímetros)

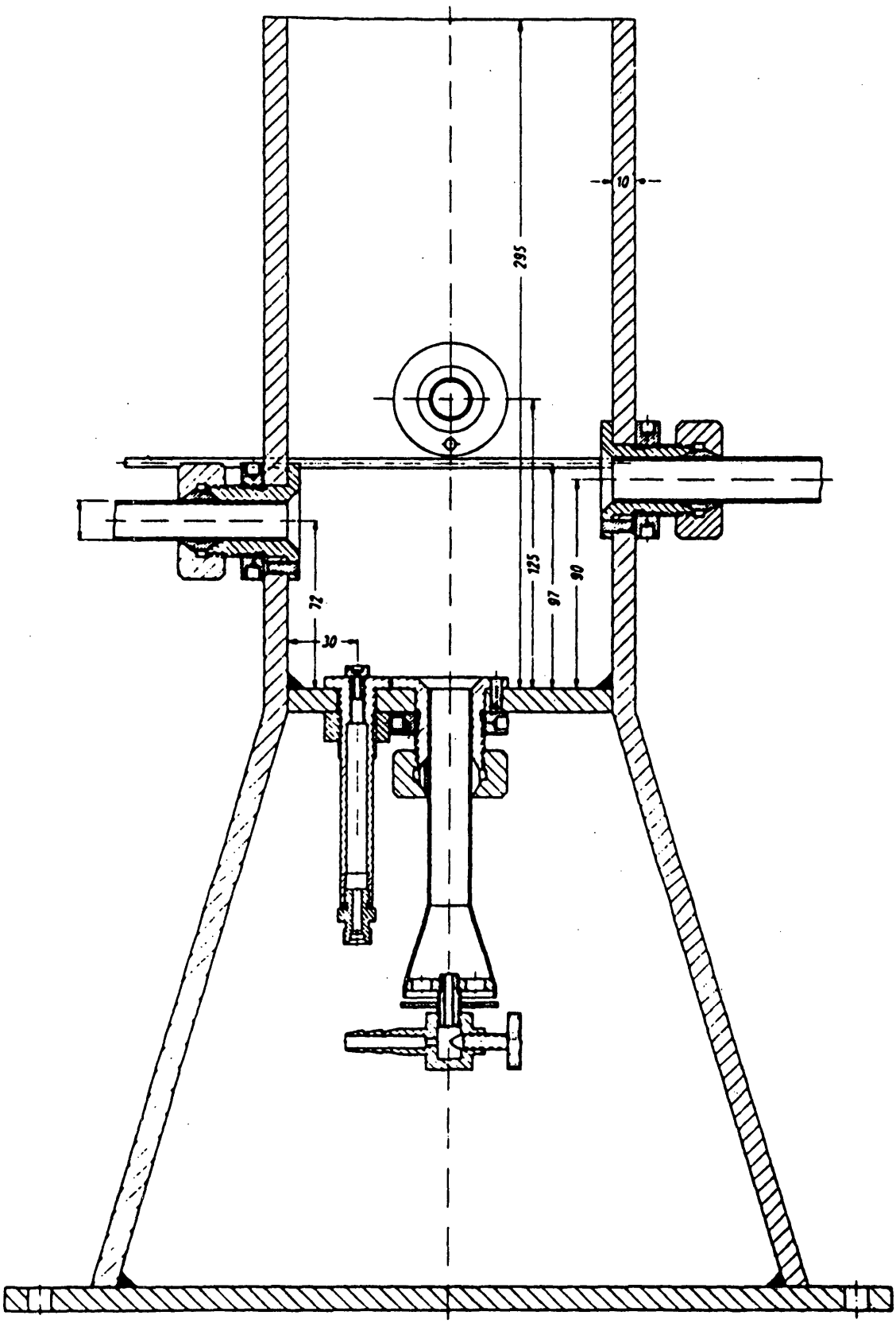


Figura 3a

Material: latón

(dimensiones en milímetros)

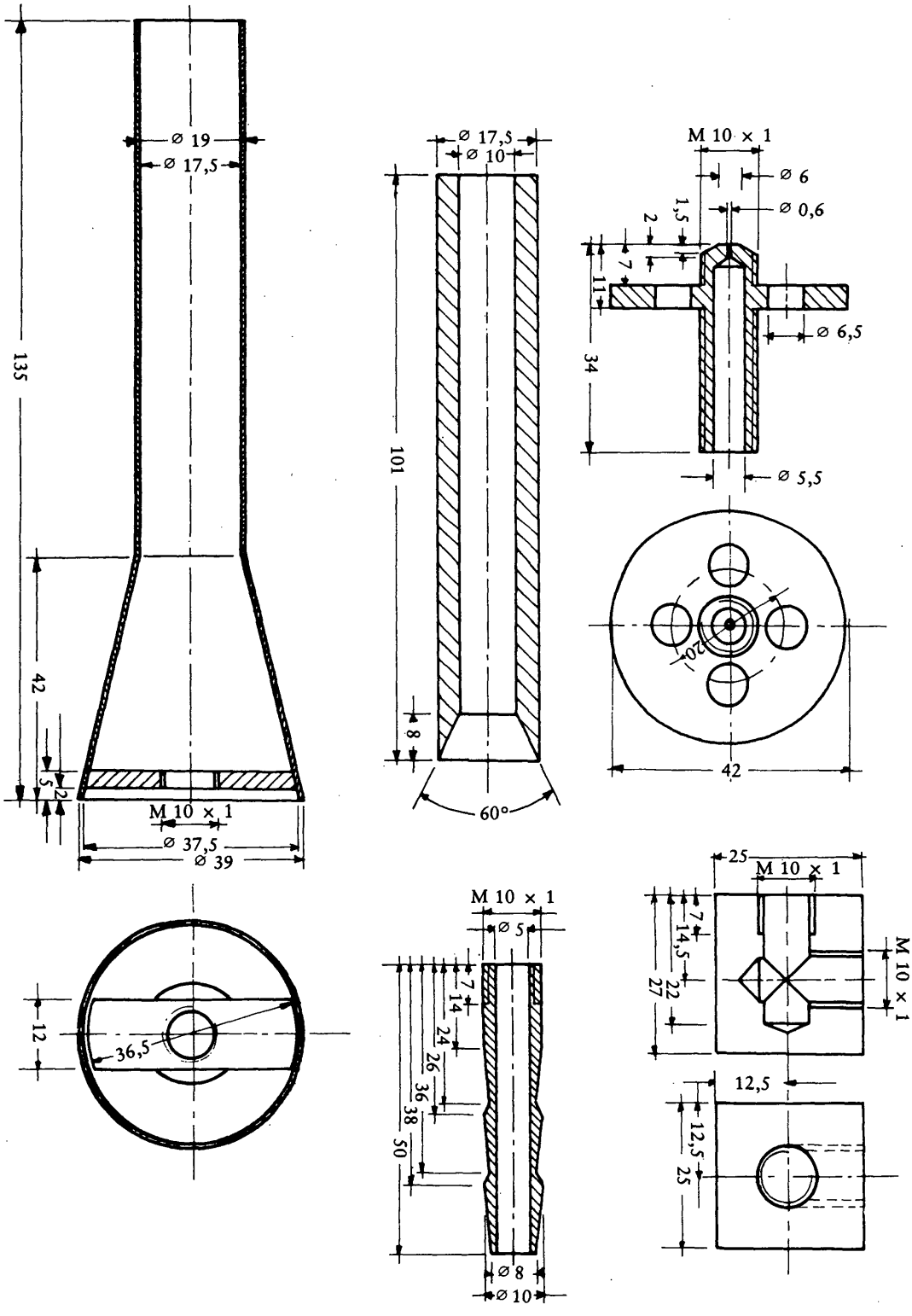
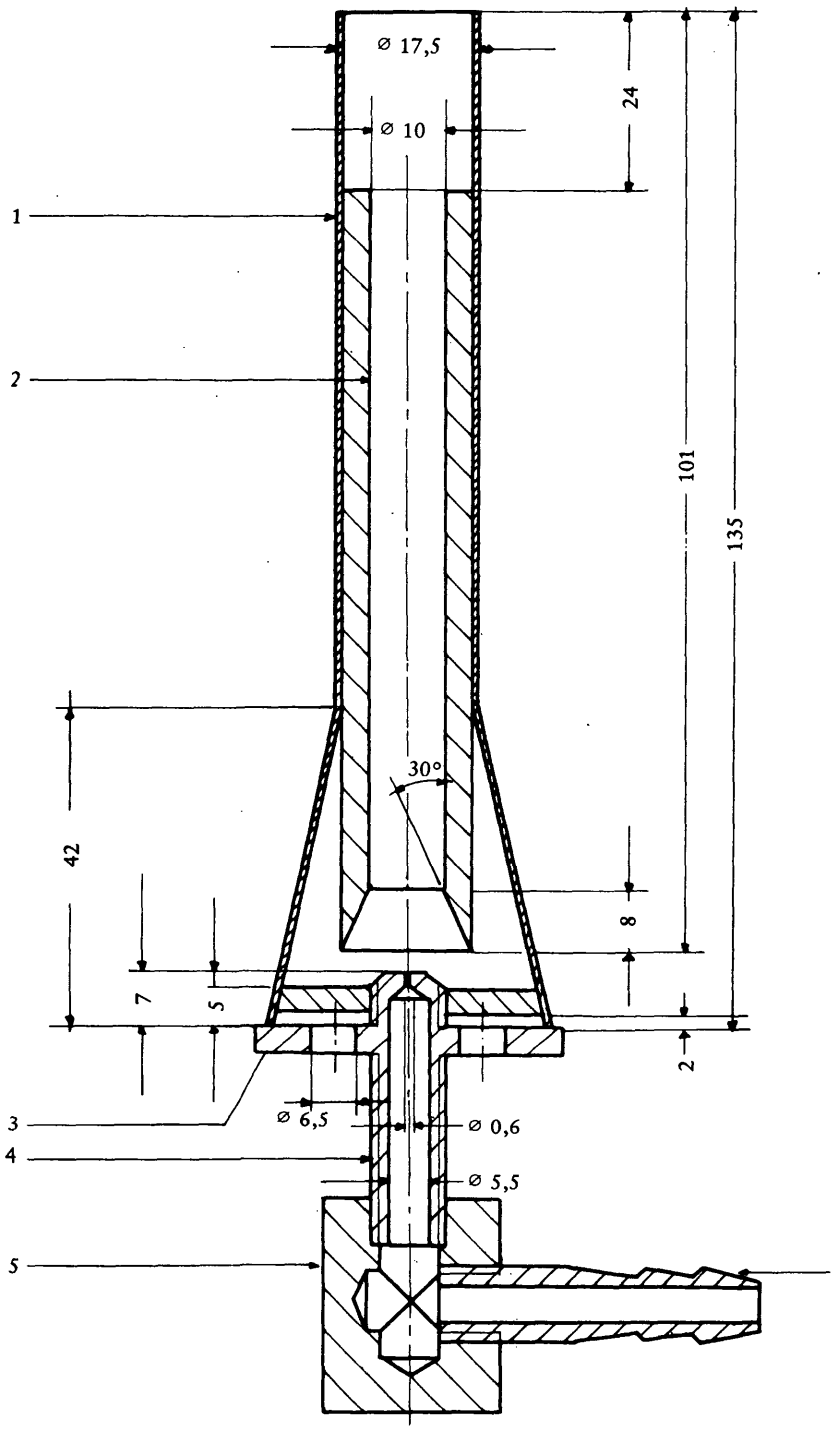


Figura 3b

Material: latón

(dimensiones en milímetros)



A.15. AUTOINFLAMABILIDAD (DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE AUTOINFLAMABILIDAD DE LOS LÍQUIDOS VOLÁTILES Y DE LOS GASES)

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de informaciones preliminares sobre la autoinflamabilidad de la sustancia. El procedimiento de ensayo que aquí se describe es aplicable a las sustancias gaseosas y líquidas volátiles y a sus vapores, las cuales, en sus formas comerciales, se puedan inflamar en presencia de aire mediante una superficie caliente. La temperatura de autoinflamación puede reducirse considerablemente debido a la presencia de impurezas catalíticas.

1.2. Definiciones y unidades

El grado de autoinflamación se expresa en términos de temperatura de autoignición. La temperatura de autoignición es la temperatura más baja a la que se inflama la sustancia de ensayo, en presencia de aire y en las condiciones definidas por el método de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

No se especifican.

1.4. Principio del método

La autoinflamabilidad de los gases y vapores se determina por medio del aparato descrito en la norma CEI 79-4.

1.5. Criterios cualitativos

La reproducibilidad varía según el intervalo de temperatura de autoencendido y el método de ensayo utilizado: máximo ± 5°C.

La sensibilidad depende del método de ensayo utilizado.

La especificidad depende del método de ensayo utilizado.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Equipo*

El aparato 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 de ensayo según el método indicado en el punto 1.6.3.

1.6.3. *Desarrollo del ensayo*

Ver normas CEI 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78 y BS 4056.

2. RESULTADOS

Registrar la temperatura de ensayo, la presión atmosférica, la cantidad de muestra utilizada, el intervalo de tiempo que transcurre hasta que se produce la inflamación.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— la indicación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— cantidad de muestra utilizada, presión atmosférica,

— resultados de las medidas (temperaturas de ensayo, resultados relativos a la inflamación, los intervalos de tiempo correspondientes),

— cualquier observación complementaria que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

Ninguna.

A.16. AUTOINFLAMABILIDAD (SÓLIDOS — DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA RELATIVA DE INFLAMACIÓN ESPONTÁNEA)

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Las sustancias explosivas y las sustancias que se inflaman en contacto con el aire a temperatura ambiente no deben someterse a este ensayo.

El objetivo del ensayo es proporcionar datos preliminares sobre la inflamabilidad espontánea de las sustancias sólidas a altas temperaturas.

Si el calor producido, bien por una reacción de la sustancia con el oxígeno, bien por descomposición exotérmica, no se disipa bastante rápidamente en el ambiente, el autocalientamiento ocasiona la inflamación espontánea. La inflamación espontánea se produce, en consecuencia, cuando la velocidad de generación 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 inflamación espontánea determinada según este método sólo debe servir para hacer comparaciones.

1.2. Definiciones y unidades

La temperatura de inflamación espontánea tal como se determina por este método es la temperatura ambiente mínima, expresada en grados centígrados (°C) a la que se inflama espontáneamente cierto volumen de una sustancia en condiciones definidas.

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Colocar un volumen definido de la sustancia de ensayo en un horno, a temperatura ambiente; registrar la curva de temperatura-tiempo en el centro de la muestra, elevando la temperatura hasta 400°C 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 inflamación espontánea.

1.5. Criterios cualitativos

No se indican.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Equipo*

1.6.1.1. Horno

Un horno de laboratorio con temperatura programable (volumen: unos 2 litros) equipado con una 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

Cortar, siguiendo el modelo de la figura 1 (ver Apéndice) un pedazo de tela metálica de acero inoxidable con una malla de 0,045 milímetros. Doblar la tela metálica y sujetarla con alambre para formar un cubo abierto por la parte superior, es decir, sin tapa.

1.6.1.3. Termopares

Termopares apropiados.

1.6.1.4. Registro

Cualquier registro de dos canales, marcado en el intervalo de 0 a 600°C o a una tensión correspondiente.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se efectua con las sustancias en su forma comercial.

1.6.3. *Desarrollo del ensayo*

LLenar el cubo con la sustancia de ensayo. Comprimir con cuidado y añadir sustancia hasta llenar por completo el cubo. Suspender la muestra en el centro del horno a temperatura ambiente. Colocar 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 en relación a 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 (ver figura 2 en el Apéndice).

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— descripción de la sustancia de ensayo,

— 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

Ninguna.

Apéndice

Figura 1

Modelo de cubo de ensayo de 20 milímetros

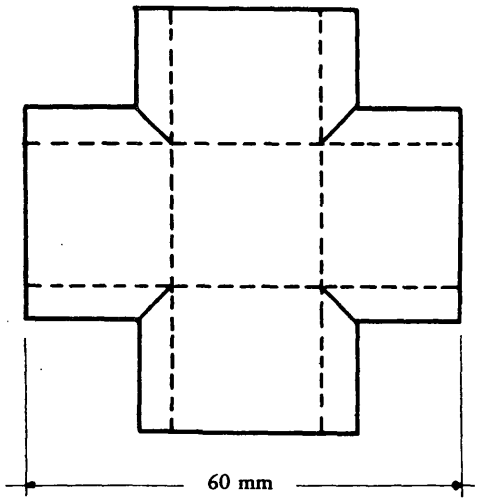
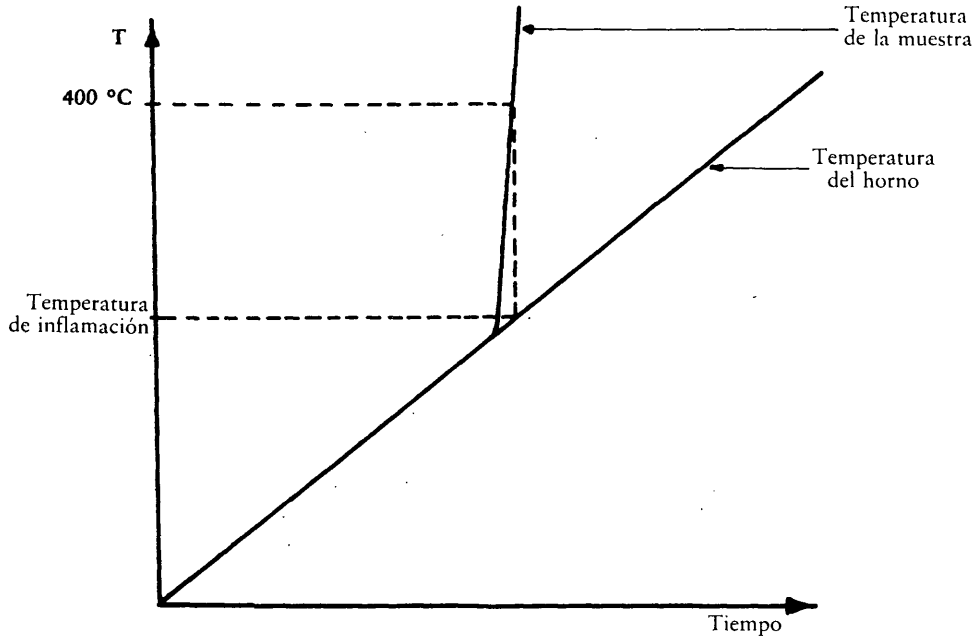


Figura 2

Curva tipo Temperatura/tiempo



A.17. PROPIEDADES COMBURENTES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Es conveniente disponer de una información completa sobre las propiedades comburentes y la posible toxicidad de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Este ensayo no es aplicable a los líquidos, a los gases, a las sustancias explosivas o fácilmente inflamables, a los peróxidos orgánicos y a las sustancias sólidas que puedan fundirse en la condiciones de ensayo.

Este ensayo es inadecuado cuando el examen de la estructura química establece, sin lugar a dudas, que la sustancia o el preparado no pueden tener una reacción exotérmica con un combustible.

Para asegurarse de que en este ensayo no hay que tomar precauciones concretas, debe efectuarse una prueba preliminar.

1.2. Definiciones y unidades

Tiempo de combustión: tiempo de reacción, expresado en segundos, tomado desde que se inicia en la zona de reacción hasta que 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 en muestras que contengan desde un 10 a un 90 % de comburente.

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.

También puede utilizarse el dicromato de potasio en el ensayo preliminar.

Deben tomarse precauciones especiales al manipular el dicromato de potasio.

La muestra de referencia está compuesta por nitrato de bario y celulosa en polvo, preparada según lo indicado en el punto 1.6 y con la velocidad de combustión máxima (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 si solo, suficiente si durante el mismo se observa que la sustancia o el preparado tienen propiedades oxidantes. En caso contrario, la sustancia o el preparado deberán someterse a un nuevo y completo ensayo.

Para efectuar este segundo ensayo se mezclan, en proporciones variables la sustancia a ensayar y un combustible definido. Con cada una de las mezclas se forma una pila y, sucesivamente, se inflaman por un extremo. La velocidad máxima de combustión se compara con la velocidad máxima de combustion de la mezcla de referencia.

1.5. Criterios cualitativos

Cualquier método de trituración y de mezclas que deba emplearse será válido siempre que la diferencia entre la velocidad máxima de combustión y la media aritmética, en los seis ensayos, no sobrepase el 10 %.

1.6. **Descripción de método**

1.6.1. *Ensayo preliminar*

Se toma la sustancia tal y como se comercializa, se seca y se mezcla toscamente con celulosa o con serrín seco, en una proporción en peso de 2 a 1. Con la mezcla se forman pilas cónicas de 3,5 centímetros de diámetro de base y 2,5 centímetros de altura, llenando sin comprimir un objeto cónico apropiado (por ejemplo, un embudo de laboratorio de cristal con el vértice tapado).

La pila se coloca sobre una superficie fría no absorbente ni conductora. La fuente de ignición está compuesta por un hilo metálico inerte de platino o níquel (que pueda calentarse, aproximadamente, a unos 1 000°C), situado más o menos 1 milímetro por encima de la superficie de ensayo y que atraviesa la base de la pila cónica. El ensayo debe realizarse bajo una campana extractora (ver punto 1.6.3).

La fuente de ignición debe permanecer encendida durante el ensayo. Se observan y se anotan la intensidad y la duración de la reacción.

Si la reacción es intensa se considerará que la sustancia o el preparado son oxidantes.

Cuando existan dudas respecto al resultado, será necesario efectuar el ensayo completo que se describe a continuación.

1.6.2. *Preparaciones*

1.6.2.1. Sustancia de ensayo

La muestra se trata con el fin de obtener una granulometría inferior a 0,125 milímetros. Se toma la sustancia tal y como se comercializa y se tamiza. La parte que quede se tritura 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 mantengan los criterios de calidad requeridos.

Antes de hacer la mezcla se desecará la muestra a 105°C hasta peso constante. Si la temperatura de descomposición de la sustancia es inferior a 105°C, se secará a una temperatura inferior.

1.6.2.2. Combustible

El combustible es celulosa en polvo, del tipo utilizado tanto en cromatografía en capa fina como 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 milímetros. El polvo de celulosa se tamiza con una malla de 0,125 milímetros.

Antes de preparar la mezcla secar la celulosa a 105°C hasta peso constante.

Si en el ensayo preliminar se utiliza serrín, se elegirá un serrín de madera tierna y se pasará por un tamiz de 1 600 micrómetros, mezclándolo y secándolo, después, a 105°C durante cuatro horas en capas de menos de 25 milímetros de espesor. Una vez enfriado se debe guardar en un envase estanco, llenándolo sin dejar ningún vació. El serrín debe utilizarse dentro de la 24 horas siguientes al secado.

1.6.2.3. Mezclas

Preparar mezclas de comburente y de celulosa que contegan de un 10 a un 90 % de comburente por cada incremento del 10 %. Para los casos límites utilizar mezclas intermediarias para determinar la velocidad máxima de combustión con más precisión.

Nota

Las mezclas de comburente y celulosa potencialmente explosivas deberán manipularse con prudencia.

Se forma la pila con ayuda de un molde metálico de sección triangular de 250 milímetros de longitud, 10 milímetros de altura interior y 20 milímetros de anchura interior. Alrededor de este molde se coloca un marco metálico que sobrepase en 2 milímetros el borde superior de la sección angular (ver figura en el Apéndice). Llenar el molde con abundante mezcla, sin comprimirla. Después de haber dejado caer una vez el molde desde una altura de dos centímetros sobre una superficie dura eliminar la materia sobrante por medio de una espátula sostenida oblicuamente. Quitar entonces el marco metálico e igualar la superficie del polvo con ayuda de un rodillo. Colocar una placa no combustible sobre el molde, voltear y desmoldar.

1.6.2.4. Fuente de ignición

Utilizar la llama de un quemador de gas o un hilo de platino calentado eléctricamente a 1 000°C.

1.6.3. *Condiciones del ensayo*

Disponer la pila bajo una campana en sentido perpendicular a la corriente de aire.

Durante el ensayo la velocidad de aspiración debe ser constante y justo suficiente para evitar que los humos se expandan por el laboratorio. Delante del aparato se coloca un cortaviento.

Dadas las propiedades higroscópicas de la celulosa y de las sustancias a ensayar, el ensayo debe efectuarse lo más rápidamente posible.

Aplicar la llama o el hilo de platino incandescente a un extremo de la pila. Medir el tiempo de reacción sobre 200 milímetros después de que la zona de reacción haya recorrido una distancia de 30 milímetros.

El ensayo se realiza con la sustancia de referencia. A continuación se efectúa el ensayo, por lo menos una vez, con cada una de las mezclas de sustancia a ensayar y celulosa.

Si se observa una velocidad máxima de reacción significativamente mayor que la de la sustancia de referencia, puede detenerse el ensayo; si no es así, se repetirá de nuevo cinco veces con las tres mezclas que hayan dado las velocidades de reacción más elevadas.

2. RESULTADOS

Por razones de seguridad, la velocidad máxima de reacción, en lugar de la media de velocidades, será la que determine las propiedades comburentes características de la sustancia examinada.

En la evaluación de una mezcla dada sólo se considerará la velocidad de combustión más elevada medida durante los seis ensayos.

Representar gráficamente la velocidad de combustión más elevada de cada mezcla en función del contenido en comburente.

Deducir del gráfico la velocidad máxima de combustión.

Las seis velocidades de combustión medidas para la mezcla que ha dado la velocidad máxima de combustión, no deben diferir en más de un 10 % de la media aritmética. En caso contrario, se deberán mejorar los métodos de trituración y mezcla.

Comparar la velocidad máxima de combustión obtenida con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia (ver punto 1.3).

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— descripción de la sustancia de ensayo,

— cualquier tratamiento a que se haya sometido la muestra (por ejemplo, triturado, secado),

— los resultados de las medidas,

— el tipo de reacción (por ejemplo: combustión rápida superficial, combustión a través de toda la masa, cualquier observación que se refiera a los productos de combustión, etc.),

— cualesquiera otras observaciones que resulten de utilidad para la interpretación de los resultados, incluida una descripción de la intensidad (llama, chispa, humo, lente incandescente, etc.) y la duración aproximada de la reacción observada durante el ensayo preliminar para la sustancia y la sustancia de referencia.

3.2. **Interpretación de los resultados**

Se considerará que una sustancia es comburente si:

a) hay una reacción intensa en el ensayo preliminar;

b) si durante el ensayo la velocidad máxima de combustión es superior o igual a la de la mezcla de referencia formada por celulosa y nitrato de bario.

4. BIBLIOGRAFÍA

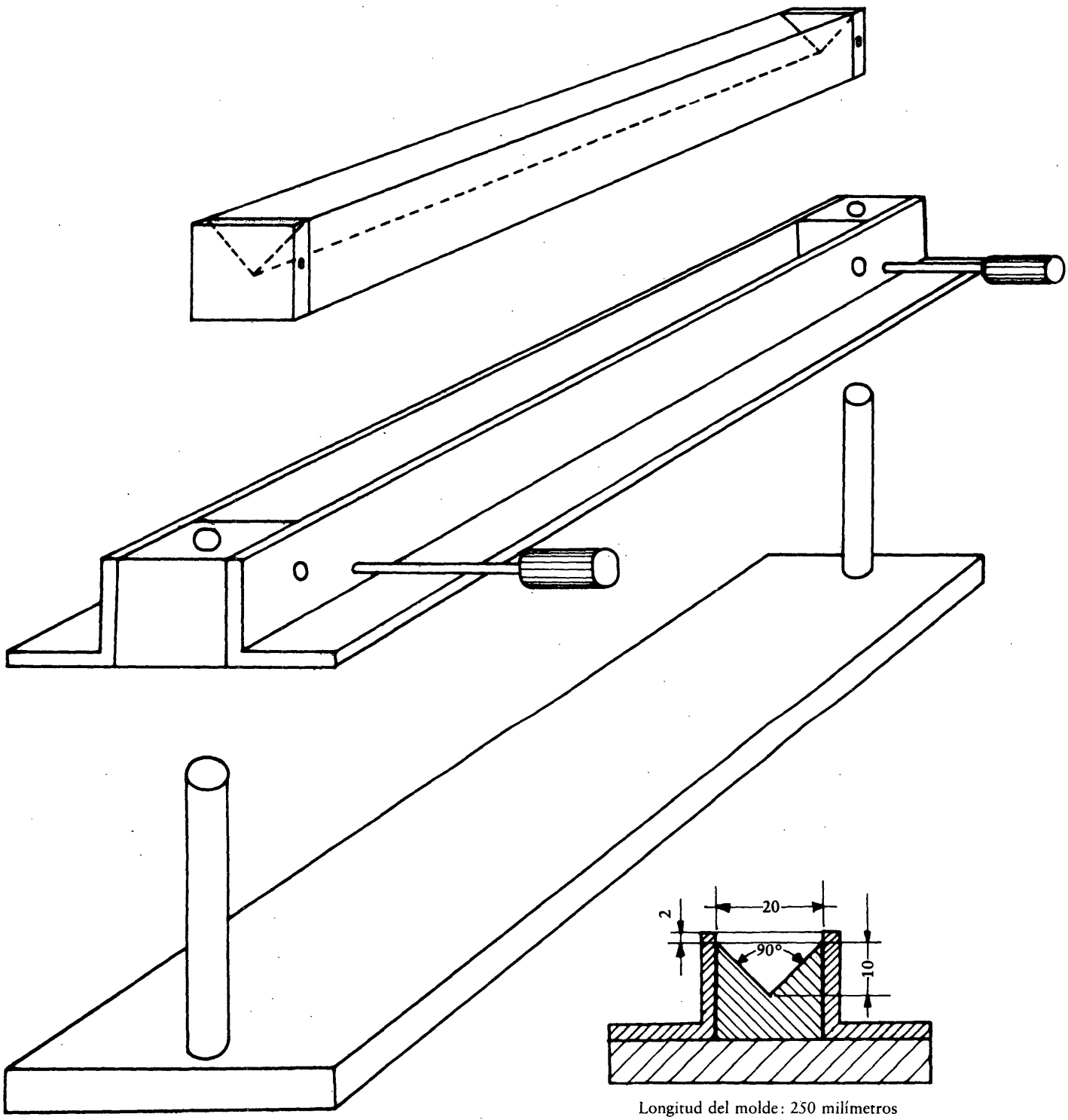
Ninguna.

Apéndice

Figura

Molde y accesorios necesarios para formar las pilas

(todas las dimensiones expresadas en milímetros)



Longitud del molde: 250 milímetros
Material: aluminio

PARTE B: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE B

A. INTRODUCCIÓN

Ver 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 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 peso de los animales sometidos al experimento (miligramo 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 volumen standard de aire (miligramo por litro).

iv) El *nivel sin efectos tóxicos* está representado por la dosis o el nivel de exposición máximo que no produce ningún efecto desfavorable detectable durante el experimento.

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 periodo de tiempo breve, en comparación con sus expectativas de vida.

iv) la *dosis máxima tolerable* (DMT) es el nivel más alto de dosis que, en el experimento en que se haya empleado, haya producido signos de toxicidad sin por ello alterar de forma importante la supervivencia de los animales, por ejemplo, en un estudio de carcinogénesis, efectos distintos a la aparición de tumores.

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.

C. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Existen límites para la extrapolación directa al hombre de los resultados obtenidos mediante la experimentación animal y los obtenidos *in vitro;* hay que tenerlo en cuenta al evaluar e interpretar los ensayos de toxicidad.

Los datos relativos al hombre, cuando sean disponibles, se consideran más idóneos para determinar los efectos potenciales de las sustancias químicas sobre la población humana.

MUTAGÉNESIS (incluidos los ensayos de diagnóstico precoz de la carcinogénesis)

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 mutuaciones génicas (puntuales) en las células procariotas tales como la *Salmonella typhimurium*; se puede utilizar también la *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 del micronúcleo o análisis de las células de la médula ósea en el estadio de la metafase).

D. 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 de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) se puede encontrar una información muy completa.

Observaciones complementarias

Cuidados que hay que prestar a los animales

Al proceder a experimentaciones toxicológicas, es esencial efectuar controles rigurosos de 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 lleve a cabo la experimentación deben ser lo más adecuados para la especie que se utiliza. Para los roedores la temperatura del local debe ser de 22°C (± 3°C) y la humedad relativa de 30 a 70 %; para los conejos y cobayas, la temperatura debe ser de 20°C (± 3) 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 los efectos tóxicos deben vigiliarse y registrarse la temperatura y la humedad y consignar las medidas en el informe final del estudio.

Cuando se utiliza alumbrado artificial, haya 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 que le sigue.

ii) alimentación

El alimento debe responder a todas las exigencias alimenticias de la especie sometida a experimentación. Cuando se incorporan sustancias al alimento de los animales, puede reducirse el valor nutritivo del alimento si se da una interacción entre la sustancia y los componentes alimenticios.

Al interpretar los resultados del ensayo debe considerarse la posibilidad de tal interacción.

Las impurezas contenidas en la dieta alimenticia cuya influencia en la toxicidad esté probada, deberán estar presentes en una concentración que no pueda interferir en el ensayo.

B. 1. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método de ensayo

Se administran oralmente, cebándoles, dosis crecientes de la sustancia de ensayo a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis por lote. 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 prácticos sobre los roedores.

1.5. Criterios cualitativos

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. Antes de comenzar el ensayo, se reparten al azar los animales jóvenes adultos y sanos 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, sino, 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 mililitros por kilogramo de peso corporal, salvo que sean soluciones acuosas en las que se pueden utilizar hasta 20 mililitros por kilogramo. 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

Salvo contraindicación, la rata es la especie más idónea.

Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso 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 dosis se utilizarán al menos diez roedores (5 hembras y 5 machos). Las hembras deberán ser nulíparas y no grávidas.

1.6.2.3. Dosis

La dosis deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten un intervalo de efectos tóxicos y de tasas de mortalidad. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva dosis/respuestas y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la DL_{50}.

1.6.2.4. Prueba límite

En un lote tratado (5 animales por sexo), se obtiene una estimación adecuada del potencial de toxicidad oral aguda, en la mayor parte de los casos y siempre que no se haya observado mortalidad debida a la sustancia, en los 14 días siguientes a la administración de una dosis de 5 000 miligramos por kilogramo.

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 administrarles la sustancia. En el caso de la rata, debe privársela de alimento durante la noche que precede a 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 administrarles la sustancia de ensayo y cebarlos a razón de una dosis única por lote. Si no es posible administrar la sustancia en una dosis única, se administrará en fracciones más pequeñas durante un período inferior 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 alimentar y hacer beber 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 atento al menos cada día laborable. Diariamente se harán otras observaciones, actuando de forma que se reduzca la pérdida de animales para el estudio, por ejemplo, autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos. La observación diaria debe concretarse, entre otras cosas, 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, 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 un examen histopatológico posterior.

2. RESULTADOS

Los datos deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote del experimento, 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, 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. La DL_{50} puede

determinarse mediante un método reconocido. La evaluación de los resultados debe incluir la relación que exista entre la exposición de los animales a la sustancia de ensayo y la incidencia de todas las anomalías así como su gravedad, incluidas las anomalías de comportamiento y clínicas, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos.

3. **INFORME**

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio, etc.,

— condiciones experimentales,

— dosis (indicando las concentraciones y, en su caso, el vehículo),

— cuadro de los datos, respuestas por sexo y por dosis (número de animales moribundos, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte después de la administración de la dosis,

— resultados de las observaciones diarias,

— valor de la DL_{50} para cada sexo, determinado el decimocuarto día (indicando con precisión el método de cálculo),

— intervalo de confianza estadística de 95 % para la DL_{50},

— curva dosis/mortalidad e inclinación de esta curva (cuando el método de cálculo lo permita),

— resultados de la autopsia,

— comprobaciones histopatógicas,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método de ensayo

Se exponen varios lotes de animales de laboratorio a la sustancia de ensayo a concentraciones crecientes 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 mueren durante el experimento así como a los que, al final del mismo, hayan sobrevivido.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

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 cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se reparten al azar los animales jóvenes adultos y sanos entre los diferentes lotes del experimento. No es necesario someterles a una exposición simulada, a menos que lo exija el dispositivo de exposición utilizado. Si es preciso, se puede añadir la sustancia a un vehículo adecuado para obtener una concentración apropiada de ésta 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, éstos no deberán producir efectos tóxicos. Pueden utilizarse resultados disponibles ya comprobados, siempre que sean los apropiados.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Salvo contraindicaciones, la rata es la especie más idonea. Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso 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.

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 un intervalo 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 CL_{50}.

1.6.2.4. Prueba límite

Si una exposición de 5 machos y 5 hembras a una concentración de 20 miligramos por litro de un gas o 5 miligramos por litro de un aerosol o de partículas durante 4 horas o — si ello no fuera posible debido a las propiedades químicas o físicas, incluso explosivas, de la sustancia —, una exposición a la concentración máxima posible no causa la muerte de ningún animal en 14 días, no será necesario continuar el experimento.

1.6.2.5. Duración de la exposición

La duración de la exposición debe ser de 4 horas, como mínimo.

1.6.2.6. Equipo experimental

Los animales deben estar expuestos a la sustancia por medio de un dispositivo de inhalación que produzca una corriente de aire que garantice, por lo menos, 12 renovaciones por hora, un contenido de oxígeno suficiente y la distribución uniforme del producto de ensayo en el aire. 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 a la sustancia quede asegurada. Por regla general, para garantizar la estabilidad de la atmósfera de una cámara, 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. Períodos 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 les expone a la concentración de ensayo en el equipo descrito, por lo menos 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 en 22°C ± 3. Lo ideal sería mantener la humedad relativa entre el 30 y el 70 %, pero en algunos casos (por ejemplo con la prueba de aerosoles) ésto puede resultar imposible. Debe privarse de alimento y de agua a los animales durante la exposición. Es conveniente utilizar un sistema de inhalación que funcione en condiciones dinámicas y que esté provisto de un dispositivo adecuado para el control analítico de la concentración. Para determinar las concentraciones de exposicíon adecuadas se recomienda proceder a un ensayo preliminar. El sistema debe permitir crear condiciones de exposicíon estables lo más rápidamente posible. El caudal del aire debe regularse de forma que las condiciones sean uniformes en toda la cámara de exposición.

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. Durante el período de exposición, la concentración no debe variar en más de ± 15 % respecto al valor medio. Sin embargo, en el caso de polvos o de ciertos aerosoles puede ser difícil conseguir este control, en cuyo caso se puede aceptar una diferencia mayor. Las sustancias en partículas y en aerosol deben ser analizadas tan a menudo como sea necesario para determinar (por lo menos una vez) la granulometría de la partículas;

c) temperatura y humedad;

d) 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 médico atento al menos cada día laborable. Diariamente se harán otras observaciones complementarias actuando de manera que se reduzca el número de animales perdidos para el estudio, por ejemplo, autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos.

La observación diaria debe concretarse entre otras cosas, 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 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 y, también, todas las modificaciones restantes. Si es necesario se extraerán tejidos para un examen histopatológico posterior.

2. RESULTADOS

Los datos deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote del experimento, 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. Las variaciones de peso deben calcularse y registrarse cuando la supervivencia del animal supere un día. La CL_{50} debe determinarse mediante un método reconocido. La evaluación de los resultados debe incluir la relación que exista entre la exposición de los animales a la sustancia y la incidencia de todas las anomalías, así como su gravedad, incluidas las modificaciones del comportamiento, las anomalías clínicas, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.;

— condiciones experimentales:

Descripción del dispositivo de exposición, incluidos su concepción, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema generador de partículas y de aerosoles, método de acondicionamiento del aire y, en su caso, modalidades de estancia de los animales en la cámara.

Debe describirse el equipo utilizado para medir la temperatura, la humedad, así como la concentración y la granulometría de las partículas y aerosoles.

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 estándar); 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, dividido por el volumen de aire),

d) en su caso, naturaleza del vehículo,

e) concentraciones reales en la zona de respiración,

f) dimensiones medias de las partículas,

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, número de animales que presentan síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte, durante o después de la exposición,

— resultados de las observaciones diarias,

— valor de CL_{50} para cada sexo, determinado al final del período de observación (indicando con precisión el método de cálculo utilizado),

— intervalo de confianza estadística de 95 % para la CL_{50},

— curva concentración/mortalidad e inclinación de la curva (si el método de cálculo lo permite),

— resultados de las autopsias,

— todas las comprobaciones histopalógicas,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 3. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

Dosis crecientes de la sustancia de ensayo se administran por aplicación cutánea a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis por lote. Se observa a continuación los efectos y la mortalidad causados por la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueren durante el experimento así como a los que sobreviven al final del experimento.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

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. Antes de comenzar el ensayo se reparten al azar animales jóvenes adultos y sanos entre los diferentes lotes del experimento. Unas veinticuatro horas antes de la prueba 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 sustancias sólidas, deberán pulverizarse previamente y humedecerse con agua o, si es preciso, con un véhículo 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 experimentales*

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 entre los animales utilizados en el ensayo no debe exceder ± 20 % del valor medio apropiado.

1.6.2.2. Número y sexo

Para cada dosis se utilizarán al menos diez animales (5 hembras y 5 machos), con una piel sana e intacta. Las hembras deberán ser nulíparas y no grávidas. A veces, puede ser justificada la utilización de un número menor de animales, sobre todo si se trata de conejos.

1.6.2.3. Dosis

Las dosis deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten un intervalo de efectos tóxicos y de mortalidad. Al elegir las dosis debe tomarse en consideración cualquier efecto irritante o corrosivo. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva dosis/respuestas y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la DL_{50}.

1.6.2.4. Prueba límite

Si en un ensayo preliminar, la aplicación de la sustancia, en dosis igual o superior a 2 000 miligramos por kilogramo sobre la piel intacta de al menos 5 animales por sexo, no ocasiona ningún efecto letal debido a la misma, en 14 días, no será necesario continuar el experimento con otras dosis.

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 al aplicar la sustancia se 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 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, preferentemente con agua o con otro procedimiento 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 autopsia o refrigeración de los animales muertos así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos. La observación diaria debe concretarse, entre otras cosas, en las modificaciones del pelo, de la piel tratada, de los ojos y 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 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 registrarse todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán tejidos para un examen histopatológico posterior.

2. RESULTADOS

Los datos 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 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 anotarse justo antes de la aplicación de la sustancia, 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. La DL_{50} debe determinarse mediante un método reconocido.

La evaluación de los resultados debe incluir la relación que exista entre la exposición de los animales a la sustancia y la incidencia de todas las anomalías, así como su gravedad, incluidas las anomalías del comportamiento y las anomalias clínicas, las lesiones macroscópicas, los cambios de peso corporal, los efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio, etc.,

— condiciones experimentales (incluido el procedimiento de limpieza de la piel),

— dosis (indicando las concentraciones y, en su caso, el vehículo),

— tabla de resultados, respuestas por sexo y por dosis (número de animales que mueren, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte después de administrar la dosis,

— resultados de las observaciones diarias,

— valor de la DL_{50} para cada sexo, determinado el decimocuarto día, indicando con precisión el método de cálculo,

— intervalo de confianza estadística de 95 % para la DL_{50} (si es posible determinarlo),

— curva dosis/mortalidad e inclinación de la curva (si el método de cálculo lo permite),

— resultados de la autopsia,

— comprobaciones histopalógicas,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D)

B. 4. TOXICIDAD AGUDA

IRRITACIÓN DE LA PIEL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

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.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

Unas veinticuatro horas antes de la prueba se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal 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.

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 su incidencia en la irritación cutánea provocada por la sustancia de ensayo. Las sustancias líquidas se aplican generalmente sin diluir.

No es necesario someter las sustancias fuertemente ácidas o alcalinas a un ensayo de irritación primario de la piel, debido al carácter previsible de sus propiedades corrosivas. Es innecesario someter a ensayo las sustancias reconocidas como muy tóxicas por vía cutánea.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Aunque puede utilizarse varias especies de mamíferos, la especie más idónea es el conejo albino.

1.6.2.2. Número de animales

Se utilizan por lo menos tres animales sanos y adultos. Puede resultar necesaria la utilización de un número mayor para precisar las respuestas equívocas.

1.6.2.3. Dosis

Salvo contraindicaciones, se aplicará al lugar elegido un volumen de 0,5 mililitros de sustancia sólida o semisólida. No es necesario un lote testigo. En cada animal, las zonas de piel vecinas no tratadas, sirven de testigo.

1.6.2.4. Período de observación

La duración del período de observación no debe fijarse de forma rígida y, aunque debe ser suficientemente larga para poder evaluar por completo el carácter reversible o irreversible de los efectos observados, normalmente no debe superar los 14 días.

1.6.3. *Procedimiento*

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. La sustancia debe aplicarse sobre una pequeña superficie de piel (unos 6 centímetros cuadrados) 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 por medio de un apósito semioclusivo apropiado durante todo el período de exposición. La utilización de un apósito oclusivo puede ser necesaria en algunos casos. Hay que impedir que el animal alcance la gasa y que ingiera o inhale la sustancia.

La duración de la exposición es de 4 horas. Si se sospecha que la sustancia puede producir una reacción cutánea fuerte (por ejemplo corrosiva) deberá reducirse la duración de la exposición (por ejemplo, a 1 hora o 3 minutos). Cuando se haya observado una reacción cutánea pronunciada en un período de exposición inferior a 4 horas, no será necesario repetir la experiencia con un período de exposición de 4 horas. Exposiciones más largas pueden ser indicadas en ciertas condiciones, por ejemplo, modos de utilización y de exposición previstos para el hombre. Al final del período de exposición debe eliminarse la sustancia, preferentemente con agua o con un disolvente apropiado, teniendo cuidado de no modificar ni la respuesta ni la integridad de la epidermis.

1.6.3.1. Observaciones y valoración

La observación de las manifestaciones eritematosas y edematosas así como su valoración debe efectuarse a los 30 y 60 minutos, y a las 24, 48 y 72 horas de haber levantado el apósito. Las reacciones de irritaciones se registran y valoran según la escala que figura en la tabla del apéndice. Otras observaciones también pueden resultar necesarias para determinar el carácter reversible de las reacciones. 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.

2. RESULTADOS

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada animal, las valoraciones para el eritema y el edema durante todo el período de observación. También deberá registrarse cualquier lesión grave, una descripción de la intensidad y naturaleza de la irritación y de la corrosión, su reversibilidad y cualquier otro efecto tóxico que se observe.

3. **INFORME**

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio, etc.,

— condiciones experimentales (incluidas las propiedades fisicoquímicas de la sustancia que sean oportunas y la técnica utilizada para la preparación y la limpieza de la piel).

— tabla de resultados sobre la reacción de irritación en cada animal y en cada observación (por ejemplo, 1, 24, 48 y 72 horas 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 efecto histopatológico,

— descripción de cualquier efecto tóxico distinto a la irritación de la dermis,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ver introducción general, parte B (punto D).

Apéndice

TABLA: VALORACIÓN DE LA REACCIÓN CUTÁNEA

Eritema y escarificación

	Valor
Sin eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (color rojo violáceo) con ligera escarificación (lesión en profundidad)	4

Formación de un edema

Sin edema	0
Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
Edema ligero (contorno de la zona edematosa bien definido por una inflamación neta)	2
Edema moderado (inflamación de aproximadamente 1 mm)	3
Edema grave (inflamación de más de 1 mm que se extiende más allá de la región expuesta)	4

B. 5. TOXICIDAD AGUDA

IRRITACIÓN DE LOS OJOS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

La sustancia de ensayo se aplica, en una dosis única, en uno de los ojos de cada uno de los animales de laboratorio; el otro ojo se utiliza como testigo. El grado de irritación se evalúa a intervalos determinados, haciéndose a continuación una descripción que permita hacer una estimación 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.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

Deben examinarse los dos ojos del animal seleccionado provisionalmente para el ensayo durante las 24 horas que preceden al experimento. No se deberán utilizar aquellos animales en los que se observe una irritación ocular, defectos oculares o una lesión de cornea ya existente.

No es necesario someter al ensayo de irritación del ojo las sustancias fuertemente alcalinas o ácidas cuyas características corrosivas ya hayan sido comprobadas en un estudio de irritación de la piel o en otros ensayos.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

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

Deben utilizarse por lo menos tres animales. Puede resultar necesario utilizar un mayor número de animales para precisar las respuestas equívocas.

1.6.2.3. Dosis

Si la sustancia de ensayo es un líquido, se utiliza un volumen de 0,1 mililitros. En cuanto a las sustancias sólidas, pastosas y las sustancias particuladas, la cantidad que se utilice debe tener un volumen de 0,1 mililitro o pesar alrededor de 0,1 gramo (siempre debe anotarse el peso). Si la sustancia es sólida o granulosa debe ser triturada en polvo fino. La medida del volumen de las sustancias particuladas debe ir precedida de una compresión ligera, por ejemplo, dando golpecitos al recipiente de medida.

1.6.2.4. Período de observación

La duración del período de observación no debe fijarse de forma rígida y, aunque debe ser suficientemente largo para poder evaluar el carácter reversible o irreversible de los efectos observados, 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 conducto lacrimal 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 no debe sufrir tratamiento y sirve de testigo. No deben aclararse los ojos de los animales durante las 24 horas siguientes a la instilación de la sustancia de ensayo. Si es necesario, puede hacerse un aclarado al final de dicho período.

Respecto a las sustancias cuyo carácter irritante quede demostrado en este ensayo, puede examinarse el poder de irrigación del ojo como medio de disminuir su efecto irritante u otros defectos nocivos. En este caso se recomienda utilizar seis conejos. En tres de ellos se efectuará el aclarado cuatro segundos después de instilar la sustancia y, en los otros tres conejos, 30 segundos después. En ambos lotes el aclarado durará 5 minutos y se practicará utilizando un volumen y una velocidad de salida que no produzcan lesiones.

1.6.3.1. Observaciones y valoración

Los ojos deben examinarse después de 1, 24, 48 y 72 horas. Si no se manifiesta irritación alguna al cabo de 72 horas, se puede poner fin al ensayo.

Puede resultar necesaria una observación prolongada en caso de daños persistentes en la cornea 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 (ver tabla) debe registrarse en cada examen. (La valoración de las reacciones oculares puede dar lugar a diversas interpretaciones, no obstante, 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, un espéculo, un biomicroscopio o cualquier otro aparato apropiado. Después de registrar las observaciones efectuadas en la hora vigesimocuarta, puede proseguirse el examen de los ojos de algunos o de todos los conejos por medio de fluoresceína.

2. RESULTADOS

Los resultados deben inventariarse en una tabla que indique, para cada animal, los índices de irritación en el momento de cada observación fijada, 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**

Se procurará incluir lo siguiente:

— datos sobre los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio, etc.),

— condiciones experimentales (incluidas las propiedades fisicoquímicas de la sustancia que sean oportunas),

— tabla de resultados sobre la reacción de irritación o corrosión, en cada animal y en el momento de cada observación (por ejemplo 1, 24, 48 y 72 horas),

— descripción de cualquier lesión grave observada,

— descripción del grado y naturaleza de la irritación o de la corrosión observada, incluida su reversibilidad,

— descripción del método utilizado para evaluar la irritación después de 1, 24, 48 y 72 horas (por ejemplo, espéculo, 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**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

Apéndice

TABLA: VALORACIÓN 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 ocultos	2
Zona nacarada, detalles del iris completamenta invisibles, dimensión de la pupila a penas discernible	3
Córnea opaca, iris no discernible a través de la opacidad	4

Iris

Normal	0
Pliegues netamente más profundos, congestión, hiperemia pericorneana 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 reacciones a la luz, hemorragia, destrucción marcada (cada uno de los síntomas o todos ellos en conjunto)	2

Conjuntiva

Enrojecimiento (se aplica a las conjuntivas palpebral y ocular, a la córnea y al iris)	
Vasos sanguíneos normales	0
Neta hiperemia de algunos vasos sanguíneos (ojos inyectados)	1
Coloración púrpura difusa, vasos sanguíneos individuales difícilmente discernibles	2
Coloración roja fuerte y difusa	3
Quemosis: párpados y/o membranas nictitantes	
Sin tumefacción	0
Cualquier tumefacción superior a la normal (incluidas 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. TOXICIDAD AGUDA

SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método de ensayo / método de maximalización con el conejillo de Indias

Después de una exposición inicial a la sustancia de ensayo (período de inducción) se somete a los animales, dos semanas después de la última exposición de inducción, a una exposición de aceleración efectuada con esta misma 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 aceleración.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. *Preparaciones*

Se reparten al azar animales jóvenes y sanos (de menos de 1 año) en lotes tratados y lotes testigo. Antes de administrar la sustancia se esquila o se rasura el pelo del lomo, procurando no arañar la piel.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Se utiliza el conejillo de Indias albino.

1.6.2.2. Número y sexo

Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras deben ser nulíperas y no grávidas. Se utilizan 20 animales para el lote tratado y 10, por lo menos, para el lote testigo. Si se utiliza un número menor de animales, se debe justificar la razón.

1.6.2.3. Dosis

La concentración de la sustancia se fija en función de la concentración máxima que pueda tolerarse en cada fase de inducción. La dosis de aceleración no debe inducir irritación alguna cutánea en los animales no sensibilizados. Estas dosis pueden determinarse mediante un estudio preliminar reducido (2 o 3 animales).

1.6.2.4. Período de observación

Durante el período de inducción, se observa la piel para controlar los posibles efectos tóxicos. Después de la exposición de aceleración se registran las reacciones cutáneas, transcurridas 48 y 72 horas.

1.6.3. *Procedimiento*

Se pesan los animales antes de la fase de inducción y después de terminar el ensayo. Se rasura el pelo del lomo. El procedimiento consta de dos fases.

1.6.3.1. Inducción

Día 0 — grupo tratado

Las inyecciones intradérmicas que a continuación se indican se ponen, por pares, en el lomo, de forma que una de las inyecciones del par se sitúe a un lado de la línea media y la otra en el opuesto:

1. 0,1 mililitro de adyuvante completo de Freund (ACF);

2. 0,1 mililitro de sustancia de ensayo, en un vehículo si fuera necesario;

3. 0,1 mililitro de sustancia de ensayo en ACF.

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 causal de la superficie de ensayo.

Día 0 — grupo testigo

Las inyecciones intradérmicas siguientes se ponen por pares en los mismos lugares citados:

1. 0,1 mililitro de ACF;

2. 0,1 mililitro de vehículo sólo;

3. 0,1 mililitro de vehículo en ACF.

Séptimo día — grupo tratado

Se rasura de nuevo el pelo de la zona de ensayo. Por medio de un vehículo adecuado se vierte la sustancia (los líquidos se pueden aplicar directamente) sobre un papel filtro que se aplica sobre la superficie de ensayo y se mantiene en contacto con la piel mediante un apósito apropiado durante 48 horas.

Séptimo día — grupo testigo

Se elimina de nuevo el pelo de la zona de ensayo. Se aplica sólo el vehículo, sobre la superficie, según el mismo método, y se mantiene en contacto con la piel mediante un apósito apropiado durante 48 horas.

1.6.3.2. Aceleración

Vigésimo primer día

Se rasura el pelo de los costados de los animales tratados y de los testigos. Se aplica un apósito con sustancia de ensayo sobre el costado izquierdo de los animales tratados mientras que en el costado derecho se les aplica un apósito únicamente con vehículo. Los pequeños retazos de tela se mantienen en contacto con la piel mediante un apósito apropiado durante 24 horas.

Se expone al grupo testigo de la misma forma.

Vigésimo tercer y vigésimo cuarto día

21 horas después de haber levantado el retazo de tela se limpia y rasura si fuera necesario la superficie sometida a ensayo.

3 horas más tarde (48 horas después de comenzar la aplicación de aceleración) 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 la primera fase de aceleración, se puede programar una segunda fase de aceleración si fuera necesario con un nuevo grupo testigo para el vehículo, más o menos una semana después de la primera prueba.

1.6.3.3. Observación y valoración

Todas las reacciones cutáneas y todas las observaciones no habituales que se derivan de las fases de inducción y de aceleración deben registrarse y consignarse en el informe.

2. RESULTADOS

Los datos deben inventariarse en un cuadro que muestre, para cada animal, las reacciones cutáneas anotadas en cada observación.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

El informe debe incluir lo siguiente:

— cepa de conejillo de Indias utilizada,

— condiciones experimentales,

— número, edad y sexo de los animales,

— peso de cada animal al comienzo y al final del ensayo,

— cada observación individual, incluido el sistema de valoración, si se hubiera utilizado,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

Observaciones

El ensayo de maximalización en conejillo de Indias (GPMT) es un ensayo de tipo auxiliar ampliamente utilizado. Aunque pueden utilizarse otros varios métodos indicados en el apéndice, el GPMT se considera el método (de referencia) más idóneo para averiguar la capacidad de una sustancia de producir una reacción de sensibilización cutánea. La sensibilidad y capacidad del método para detectar los posibles agentes sensibilizantes de la piel humana, se consideran esenciales para establecer un sistema de clasificación de la toxicidad aplicable a la sanidad pública. La elección de cualquier otro método debe regirse por criterios que garanticen su validez. Entre tales criterios figura una respuesta previsible a los alérgenos tipo como el 2,4-dinitroclorobenceno o la p-fenilendiamine, o cualquier otro sensibilizante potencial elegido en función de la clase de sustancia sometida a ensayo.

No existe un método de ensayo único que permita identificar de manera correcta todas las sustancias que pueden, potencialmente, producir una sensibilización de la piel humana y que, además, sea adecuado para todas las sustancias.

Algunos factores, tales como las características físicas de una sustancia, incluida su capacidad de penetrar en la piel, y las formas posibles de contacto con el hombre deben tenerse en cuenta al elegir el tipo de ensayo. Los ensayos que utilizan conejillos de Indias pueden subdividirse en ensayos de tipo adyuvante, en los que cualquier estado alérgico se potencia mediante la disolución o la suspensión de la sustancia de ensayo en el adyuvante completo de Freund y en ensayos de tipo no adyuvante. En algunos casos, puede ser preferible un ensayo en el que se efectue una aplicación local en lugar de la inyección intradérmica utilizada en el ensayo de maximalización en el conejillo de Indias, debiéndose valorar de nuevo las características físicas de la sustancia de ensayo y las condiciones de una posible exposición

humana. Independientemente del método utilizado, la sensibilidad de la cepa de los conejos de Indias utilizada en el ensayo de sensibilidad cutánea debe verificarse a intervalos regulares (6 meses) con ayuda de sensibilizantes potentes y moderados, conocidos, que conduzcan a un número satisfactorio de respuestas positivas.

Apéndice

Ensayo	Draize	Adyuvante completo de Freund (ACF)	Optimizaçión Mauer	Buehler	Ensayo epicutáneo al aire libre	Adyuvante fraccionado
Especie	Conejo de Indias	Conejo de Indias	Conejo de Indias	Conejo de Indias	Conejo de Indias	Conejo de Indias
Vía de administración	intradérmica (id)	intradérmica (id)	intradérmica (id)	epicutánea (ec)	epicutánea (ec)	id y ec
Número de animales del lote de experimental	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Número de lotes experimentales	1	1	1	1	1 a 6	1
Número de animales del lote testigo	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Exposición de inducción - Via	id	id	id	dérmica	dérmica	id y dérmica
Número de exposiciones	10	5	9	3	20 o 21	4
Periódo de exposición	—	—	24 h	6 horas cada vez	continua	48 horas cada vez
Tipo de apósito	—	—	—	cerrado	al aire libre	cerrado
Lote(s) experimental(es)	SE (1)	SE en ACF	SE en ACF	SE	SE	SE
Lote testigo	no	sólo ACF	no	no	sólo vehículo (v)	no
Zona del ensayo	costado izquierdo	costado derecho	espalda	costado izquierdo	costado derecho	lomo
Frecuencia	cada 2 días	cada 2 días	cada 2 días	cada 7 días	diariamente	0, 2, 4, 7 días
Duración	0—18 días	0—8 días	0—21 días	0—14 días	0—20 días	0—7 días
Concentración	2—10 dos veces la de la primera	la misma en todas partes	0,1 ml de 0,1 %	la misma en todas partes	a misma dentro del lote, diferente de un lote a otro	la misma en todas partes
Exposición de aceleración - Via	id	dérmica	id	dérmica	dérmica	dérmica
Número de exposiciones	1	2	2	1	2	1
Días	35	22 y 35	14 y 28	28	21 y 35	20
Período de exposición	—	—	24 h	6 h	—	24 h
Tipo de apósito	—	al aire libre	—	cerrado	al aire libre	cerrado
Lote(s) experimental(es)	SE	SE	SE	SE	SE	SE
Lote testigo	SE	SE	SE	SE	SE	SE
Zona del ensayo	costado derecho	costado izquierdo	espalda, otra zona	costado derecho	costado izquierdo	lomo
Concentración	igual que la primera	4 diferentes	0,1 ml de 0,1 %	la misma que para la inducción	4 diferentes	la mitad de la utilizada para la inducción
Evaluación (número de horas después de la exposición de aceleración)	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 y/o 72	24, 48

(1) SE = sustancia de ensayo.

B. 7. TOXICIDAD SUBAGUDA POR VÍA ORAL

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, 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 crecientes 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 cualitativos

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 los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se reparten al azar animales jóvenes y sanos en lotes. Las sustancias de ensayo pueden ser administradas con el alimento, por cebadura, 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 experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Salvo contraindicaciones, la rata es la especie más idónea. Hay que utilizar animales jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente; en condiciones ideales la sustancia debe administrarse antes de que las ratas alcancen las seis semanas; 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 diez 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.

1.6.2.3. Dosis

Se utilizan al menos 3 dosis y un testigo. A excepción de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma forma que los de los lotes de experimento. Si se utiliza un vehículo para facilitar la administración, éste se administrará también a los testigos, procediendo de la misma forma que con los lotes tratados; el volumen será el mismo que se administra al lote tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen (o raramente) la muerte. La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico. Si se dispone de datos 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 graduación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a las dosis bajas o intermedias, así como en el lote testigo, la incidencia de la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

Cuando la sustancia de ensayo se administra con el alimento, se puede utilizar, o bien una concentración alimenticia constante (ppm o mg/kg), o una dosis constante en función del peso corporal de los animales; debe precisarse el método escogido. En el caso de una sustancia administrada por cebado, las dosis deben administrarse todos los días a la misma hora. Las dosis deben adaptarse (semanal o bisemanalmente) a fin de conservar un nivel de dosis constante en función del peso del animal.

1.6.2.4. Prueba límite

Si durante un experimento de 28 días efectuado según el método descrito anteriormente, con una dosis de 1 000 miligramos por kilogramo 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, es innecesario continuar el experimento. Cuando se trata de sustancias de baja toxicidad, administradas con el régimen alimenticio, 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 período de 28 días. Los animales de los lotes satélites 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 diaria debe concretarse, entre otras cosas, en las modificaciones del pelo, de la piel, de los ojos y de las mucosas, del aparato respiratorio, del sistema circulatorio, de los sistemas nerviosos autónomo y central, de la actividad somatomotriz y del comportamiento. El consumo alimenticio (y el consumo de agua cuando la sustancia de ensayo se administre con el agua de beber) y el peso de los animales deben determinarse cada semana.

Es necesario observar regularmente a los animales para tratar de que, en la medida de lo posible, no se pierdan para el experimento por razones como el canibalismo, autolesión de los tejidos o error de emplazamiento al término del experimento. Se hará la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados, pero no de los satélites. Los animales moribundos se retirarán inmediatamente y se les hará la autopsia.

Al terminar el período 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 en 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 criterio sobre la exploración de las funciones hepática y renal: alanina aminotransferasa (conocida antiguamente con el nombre de tansamina glutamopirúvica) y aspartato aminotransferasa (conocida antiguamente con el nombre de transamina glutamo-oxaloacética) del suero, nitrógeno uréico, albúmina, creatinina plasmática, bilirubina total y proteínas serosas totales.

Las demás determinaciones que puedan ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada sobre el calcio, el fósforo, los cloruros, el sodio, el potasio, la glucosa, los lípidos, las hormonas, el equilibrio ácido-básico, la metahemoglobina, 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

Se debe practicar una autopsia general a todos los animales del ensayo. El hígado, los riñones, las glándulas suprarenales y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección, para evitar que se sequen. El hígado, los riñones, el bazo, las glándulas suprarenales y el 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 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 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 datos deberán inventariarse en una tabla que indique, para cada lote del experimento, 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. Podrá utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio, etc.,

— condiciones experimentales,

— 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 sea posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 8. TOXICIDAD SUBAGUDA POR INHALACIÓN

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancia de referencia

Ninguna.

1.4. Principios del método

Se exponen varios grupos de animales, diariamente, durante un tiempo determinado, a la sustancia de ensayo en concentraciones crecientes, una concentración determinada 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 cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos, los 5 días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo se reparten al azar los animales jóvenes y sanos en lotes. Si es necesario, se puede añadir un vehículo apropiado a la sustancia de ensayo para obtener una concentración apropiada 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.

1.6.3. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Salvo contraindicaciones, la rata es la especie más 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 al menos (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 por 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.

1.6.2.3. Concentraciones 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 corresponder al 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 del grupo experimental. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen, o raramente, la muerte. La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico. Si se dispone de datos 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 graduación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a las concentraciones bajas e intermedias, así como en los lotes testigo, la incidencia de 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 periodos 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 de aire continuo 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, a 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 observacíon

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 entre 5 y 7 días por semana, durante un período de 28 días. Los animales de los grupos satélites destinados a observaciones complementarias deberán mantenerse en observación durante 14 días más, sin tratamiento, con el fin de descubrir la curación 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 óptimas, la humedad relativa debe mantenerse entre 30 y 70 %, pero, en algunos casos, esto puede resultar imposible (por ejemplo, ensayos con aerosoles). 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 unas condiciones de exposición estables lo más rápidamente posible.

Se debe medir y controlar:

a) el caudal del 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 polvo o aerosoles, es difícil alcanzar este grado de control, aceptándose en dichos casos una diferencia mayor. Durante todo el experimento hay que mantener las concentraciones diarias lo más constantes posible. Se medirá el reparto granulométrico de las partículas y del aerosol tan frecuentemente como sea preciso para estimar su estabilidad;

c) temperatura y humedad;

d) las observaciones tienen lugar durante y después de la exposición y se registran sistemáticamente; deben conservarse los datos individuales 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 diaria debe concretarse, entre otras cosas, en las modificaciones del pelo y de la piel, de los ojos y de las mucosas, del aparato respiratorio, del sistema circulatorio, de los sistemas nerviosos autónomo y central, de la actividad somato-motriz y del comportamiento. El peso de los animales debe determinarse cada semana. Se recomienda igualmente medir el consumo alimenticio cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para procurar que no se pierdan para el experimento por razones como el canibalismo, autolesiones de los tejidos o error de emplazamiento. Al final del experimento se practicará la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos deberán ser inmediatamente retirados y se les practicará la autopsia.

Los análisis 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 en hemoglobina, el recuento de hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria, así como un estudio de coagulación;

ii) determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre incluyendo al menos un criterio sobre la exploración de las funciones hepática y renal: alanina aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de transaminasa glutamopirúvica) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocido con el nombre de transamina glutamo-oxalacético) del suero, nitrógeno uréico, albúmina, creatinina plasmática, bilirubina total y proteínas serosas totales. Las demás determinaciones que puedan ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada sobre el calcio, el fósforo, los cloruros, el sodio, el potasio, la glucosa, los lípidos, las hormonas, el equilibrio ácido-básico, la metahemoglobina, la actividad colinosterásica, etc. Si es necesario pueden realizarse otros análisis bioquímicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.3.1. Autopsia

Se deberá practicar una autopsia a todos los animales del experimento. El hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales y los testículos deberán pesarse 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, las glándulas suprarrenales, el corazón, así como todos los órganos que presenten lesiones importantes o modificaciones volumétricas. La rinofaringe y los pulmones deben extraerse enteros, pesarse y tratarse con un fijador adecuado para conservar la estructura pulmonar. Se considera que una perfusión con fijador es un método eficaz.

1.6.3.2. Examen histopatológico

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos que se conserven del lote expuesto a la concentración más alta y del o los lotes testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones inducidas por la sustancia de ensayo en la concentración más elevada, deben ser examinados en todos los grupos que hayan estado expuestos a concentraciones más bajas. A los animales de todos los grupos satélites deberá sometérseles a un examen histopatológico, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los otros lotes tratados.

2. RESULTADOS

Los datos deben inventariarse en una tabla que indique, para cada lote experimental, 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 estadísitico apropiado. Puede utilizarse cualquier método estadístico ampliamente reconocido.

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio, etc.,

— condiciones experimentales,

descripción del aparato de exposición, incluida concepción, tipo, dimensiones, fuente de aire, sistema generador de partículas y de aerosoles, método de acondicionamiento del aire, tratamiento del aire aspirado y, en su caso, modalidades de estancia de los animales en la cámara de ensayo. Deben describirse el equipo utilizado para medir la temperatura y, en su caso, la estabilidad de las concentraciones de aerosoles y la granulometria.

Datos relativos a la exposición:

deben presentarse en forma de tabla, indicando los valores medios y una medida de la variabilidad (por ejemplo, desviación estándar); deben incluir:

a) los caudales de aire a través del dispositivo de inhalación,

b) la temperatura y la humedad del aire,

c) las 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) dimensiones medias de las partículas (si es necesario),

— respuesta tóxica por sexo y concentración,

— momento de la muerte durante el experimento o indicación de que los animales han sobrevivido al mismo,

— efectos tóxicos u otros, nivel que no causa ningún efecto,

— momento de observación de cualquier síntoma anormal y evolución del mismo,

— cantidad de alimento y peso corporal,

— análisis hematológicos practicados y resultados completos,

— pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados completos,

— resultados de las autopsias,

— 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**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 9. TOXICIDAD SUBAGUDA POR VÍA CUTÁNEA

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, 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 crecientes a varios lotes de animales de laboratorio, una dosis determinada 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 experimento así como a los que sobreviven al final del experimento.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento por lo menos los cinco días anteriores. Antes de comenzar el ensayo se reparte al azar a los animales jóvenes y sanos 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 24 horas antes del ensayo. Durante el esquile 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 de ensayo sea sólida (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 experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Pueden utilizarse la rata, el conejo o el conejillo de Indias. Se pueden utilizar también otras especies pero, en ese caso, se habrá de justificar su utilización. Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales no deberá exceder del 20 % del valor medio.

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 los efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento.

1.6.2.3. Dosis

Se utiliza al menos tres dosis 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 las sustancias de ensayo, debe tratarse a los animales del lote testigo de la misma forma que a los de los lotes experimentales. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, éste se administrará también a los testigos, en las mismas condiciones que a los lotes tratados; la dosis será la misma que se administra al grupo tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen (o raramente) la muerte. La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico. Si se dispone de datos 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 incidencia de 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 los demás efectos tóxicos en la dosis más elevada. 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 miligramos por kilogramo, o con una dosis más elevada en función de una posible exposición humana (si se conoce), no se ha observado ningún efecto tóxico, es 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 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 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 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.

Al término del periodo de exposición, hay que eliminar cualquier residuo de sustancia, preferentemente, con agua, o con cualquier otro procedimiento de limpieza de la piel adecuado.

Deben observarse todos los animales diariamente y registrar los síntomas de toxicidad, así como el momento de su aparición, su intensidad y duración. La observación diaria debe concretarse, entre otras cosas, en las modificaciones del pelo y de la piel, de los ojos y las mucosas, del aparato respiratorio, del sistema circulatorio, de los sistemas nerviosos central y autónomo, de la actividad somato-motriz y del comportamiento. Semanalmente deben determinarse los pesos de los animales. También se recomienda medir el consumo alimenticio semanalmente. Es necesario observar regularmente a los animales y procurar que no se pierdan para el experimento por razones como el canibalismo, autolesiones de los tejidos o error de emplazamiento . Al término de la experiencia se practica la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes no satélites. Los animales moribundos se retirarán inmediatamente y se les practicará la autopsia.

Al terminar el experimento 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 en 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 criterio sobre la exploración de las funciones hepática y renal: alanina aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de transamina glutamopirúvica) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocido con el nombre de transminasa glutamo-oxaloacética) del suero, nitrógeno uréico, albúmina, creatinina plasmática, bilirubina total y proteínas serosas totales.

Las demás determinaciones que puedan ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada sobre el calcio, el fósforo, los cloruros, el sodio, el potasio, la glucosa, los lípidos, las hormonas, el equilibrio ácido-básico, la metahemoglobina, la actividad colinesterásica.

Si es necesario, pueden realizarse otros análisis bioquímicos clínicos para profundizar el estudio de los efectos tóxicos observados.

1.6.4. *Autopsia*

Se practicará una autopsia general a todos los animales sometidos al ensayo. El higado, 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 los tejidos (es decir la piel normal y tratada) el higado, los riñones 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 histológico 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. A los animales del lote satélite deberá sometérseles 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 datos deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote experimental, el número de animales al comienzo de la prueba y el número de animales que presentan cada tipo de lesión.

Todos los resultados observados deben evaluarse por medio de un método estadítico adecuado. Puede utilizarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— datos relativos a los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimenticio),

— condiciones experimentales,

— dosis (en su caso, también el vehículo) y concentraciones,

— nivel que no produce ningún efecto, si es posible,

— respuesta tóxico por sexo y dosis,

— momento de la muerte durante el experimento o indicación de que los animales han sobrevivido al mismo,

— efectos tóxicos u otros,

— momento de la observación de cualquier síntoma anormal y su evolución,

— cantidad de alimento y peso corporal,

— análisis hematológicos practicados y resultados completos,

— pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados completos,

— 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**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 10. OTROS EFECTOS: MUTAGÉNESIS

ENSAYO CITOGENÉTICO *IN VITRO* EN MAMÍFERO

MÉTODO

1.1. **Introducción**

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. **Definición**

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. **Sustancia de referencia**

Ninguna.

1.4. **Principio del método**

El ensayo citogenético *in vitro* es un ensayo de mutagénesis a corto plazo destinado a descubrir aberraciones cromosómicas estructurales en las células de mamíferos en cultivo. Pueden utilizarse cultivos de linajes celulares establecidos, así como cultivos de células primarias. Después de exposición a las sustancias de ensayo en presencia y en ausencia de una mezcla de activación de enzimas hepáticas (fracción postmitocrondial suplida de cofactores), se tratan los cultivos celulares con un inhibidor de uso mitótico, como la colchicina, con el fin de acumular las células en fase de mitosis de tipo metafásico (c-metafase). Las células se recolectan en el momento oportuno y se efectuan preparaciones cromosómicas. Las preparaciones se colorean y las células en metafase se analizan para descubrir las aberraciones cromosómicas.

1.5. **Criterios cualitativos**

Ninguno.

1.6. **Descripción del método**

1.6.1. *Preparaciones*

Las sustancias de ensayo se preparan en medio de cultivo o se disuelven en vehículos apropiados antes del tratamiento de las células. Se utilizan linajes celulares establecidos o cultivos de células primarias, por ejemplo células de hamsters chinos y linfocitos humanos.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

Número de cultivos

Se utilizan al menos dos cultivos para cada punto experimental.

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 un logaritmo; la dosis más elevada reducirá la actividad mitótica alrededor de un 50 %.

Condiciones de cultivo:

Se utilizan un medio de cultivo y condiciones de incubación apropiados (por ejemplo, temperatura, recipientes de cultivo, concentraciones en CO_2 y humedad).

1.6.3. *Procedimiento*

1.6.3.1. Preparación de los cultivos

Linajes celulares establecidos: las células se obtienen a partir de cultivos madres (por ejemplo, tripsinisación o separación por agitación vigorosa) se siembran en recipientes de cultivo a la densidad adecuada y se incuban a 37°C.

Linfocitos humanos: se añade sangre 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) Tratamientos sin mezcla de activación de enzimas hepáticas

Todos los tratamientos deben cubrir el período de un ciclo celular completo y los esquemas de fijación deben garantizar el análisis de las primeras mitosis posteriores al tratamiento de las células tratadas en los distintos estadios de su 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 linajes celulares establecidos cuando estos últimos estén en su fase de crecimiento exponencial. Los cultivos de linfocitos humanos se tratan cuando aún están en estado semisincrónico. Si la sustancia de ensayo modifica la duración del ciclo celular el intervalo de fijación debe modificarse en consecuencia.

ii) Tratamientos con mezcla de activación de enzimas hepáticas

La mezcla de activación de enzimas hepáticas utilizada para el tratamiento de la sustancia de ensayo, 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 muestras 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

Una o dos horas antes de su recolección se tratan los cultivos celulares por medio de un inhibidor de huso mitótico. Para la preparación de los cromosomas, cada cultivo se recolecta y trata por separado.

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 láminas y la coloración.

Análisis

Para descubrir las aberraciones cromosómicas, se analizan al menos 100 metafases, bien distribuidas en cada cultivo. Las láminas se codifican antes del análisis.

Para 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.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tabla. Se registrarán por separado las aberraciones de tipo cromatidiano (lagunas, fracturas, intercambios), las aberraciones de tipo cromosómico (lagunas, fracturas, cromosomas minutos, anillos, discéntricos, 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.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— células utilizadas,

— condiciones experimentales: composición del medio, concentración en 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 utilizado, testigos positivos y negativos,

— número de cultivos celulares,

— número de metafases analizadas (por separado para cada cultivo),

— tipo y número de aberraciones por separado para cada cultivo tratado y testigo, número modal de cromosomas en los linajes celulares establecidos utilizados,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 11. OTROS EFECTOS: MUTAGÉNESIS

ENSAYO CITOGENÉTICO *IN VITRO* EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFERO, ANÁLISIS CROMOSÓMICO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El ensayo citogenético *in vitro* es un ensayo de mutagénesis a corto plazo destinado a descubrir las 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 utiliza la médula ósea de mamíferos expuestos, por las 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 impiden la formación del huso, con el fin de acumular las células en fase de mitosis del tipo metafásico (c-metafase). Se efectúan preparaciones de cromosomas a partir de células secadas al aire, y, después, coloreadas; a continuación se analizan las metafases en el microscopio para descubrir las aberraciones cromosómicas.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

Se disuelven las sustancias de ensayo en una solución fisiológica. 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 se utiliza un vehículo para administrar la dosis, no debe interferir con la sustancia de ensayo ni producir efectos tóxicos.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan roedores tales como la rata, el ratón o el hamster chino. Se reparten al azar animales jóvenes, adultos y sanos 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 experimental establece varios momentos de observación después del tratamiento.

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 repetido. No obstante, no se podrá aplicar si la sustancia de ensayo no produce un efecto citotóxico sobre la ósea. La administración se hace generalmente por vía oral o por inyección intraperitíoneal. También 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 experimento un lote testigo negativo (disolvente).

1.6.2.5. Dosis

Para el informe 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, por ejemplo, una inhibición parcial de la mitosis.

Pueden utilizarse otras dosis 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, una sola vez, la sustancia de ensayo en la dosis máxima tolerada. Después del tratamiento, se extraen muestras en tres ocasiones. La toma intermedia debe efectuarse a las 24 horas. Dado que la cinética del ciclo celular puede verse influida por la sustancia de ensayo, se realiza una toma anterior y una toma posterior a intervalos apropiados entre las 6 y las 48 horas siguientes a la administración de la sustancia. Cuando se utilicen dosis suplementarias, hay que extraer las muestras en el período de sensibilidad máxima, o si no se conoce, 24 horas después del tratamiento;

ii) si la información farmacocinetica y metabólica aconseja un programa de tratamiento repetido, se puede aplicar una dosificación 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 de células en c-metafase apropiado. 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, después, se distribuyen en láminas. Una vez se hayan secado al aire, las láminas se colorean.

Análisis

Las láminas se codifican antes de analizarlas 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 cromatidiano e isocromatidiano (lagunas, fracturas) y el número de metafases anormales (lagunas incluidas y excluidas) así como los índices mitóticos (cuando se establezcan). Igualmente se registrarán las medias y las desviaciones tipo 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**

Se procurará incluir la siguiente:

— especie, cepa y edad de los animales utilizados,

— número de animales de cada sexo de los lotes experimentales y de los testigos,

— condiciones experimentales: descripción detallada del programa de tratamiento y de extracción, dosis, duración del tratamiento y 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,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 12. OTROS EFECTOS: MUTAGÉNESIS

ENSAYO DEL MICRONÚCLEO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancia de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El ensayo del micronúcleo es un ensayo *in vivo* a corto plazo destinado a descubrir las lesiones cromosómicas o las 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 abandonados al producirse 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 jóvenes eritrocitos policromáticos 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 colorean 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 cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

Las sustancias de ensayo se disuelven en una 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 experimentales*

1.6.2.1. Animales de laboratorio

Se recomienda utilizar ratones, pero también pueden utilizarse otros mamíferos. Se reparten al azar animales jóvenes, adultos y sanos 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 experimental establece varios momentos de observación después del tratamiento.

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 repetido. No obstante, no 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. También pueden ser apropiadas otras vías de administración.

1.6.2.4. Utilización de testigos positivos y negativos

Se utilizarán testigos positivos y negativos (disolventes) en cada experimento.

1.6.2.5. Dosis

Para el informe 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 citoxicidad, por ejemplo, una modificación de la relación eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos.

Pueden utilizarse otras dosis 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, una sola vez, la sustancia de ensayo en la dosis máxima tolerada. Las tomas de muestras deben efectuarse en el momento correspondiente a la sensibilidad máxima del ensayo la cual varía según la sustancia de ensayo. Por eso, cuando el ensayo se efectúa con la dosis máxima, se extraen muestras de médula ósea al menos en tres ocasiones, una al comenzar el tratamiento y dos más a intervalos adecuados sin sobrepasar no obstante las 72 horas.

   Cuando se utilizan 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 fármaco-cinética y metabólica aconseja un programa de tratamiento repetido, se puede aplicar una dosificación repetida, tomando las muestras al menos en tres ocasiones, la primera 12 horas después del último tratamiento, y las otras dos a intervalos adecuados sin sobrepasar no obstante las 72 horas.

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 feto de ternera. Las células se sedimentan por centrifugación, descartando el sobrenadante. Se depositan gotas de la suspensión celular homogénea y se distribuyen en frotis sobre láminas. Una vez se hayan secado al aire, las láminas se colorean.

Análisis

Las láminas se codifican antes de analizarlas en el microscopio. Se busca la presencia de micronúcleos entre, al menos, 1 000 eritrocitos policromáticos por animal.

Para cada animal, se determina la relación entre eritrocitos normopolicromados y policromados, sobre la base de 1 000 eritrocitos.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tabla. Se registrarán por separado y para cada animal tratado y testigo, el número de eritrocitos policromáticos y el número de eritrocitos policromáticos con micronúcleos, así como el porcentaje de células micronucleadas y la relación entre eritrocitos normocromáticos y policromáticos. Se registran igualmente las medias y las desviaciones tipo 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**

Se procurará incluir lo siguiente:

— especie, cepa y edad de los animales utilizados,

— número de animales de cada sexo de los lotes tratados y de los testigo,

— condiciones experimentales: descripción detallada de los programas de tratamiento y de extracción, dosis, datos relativos a la toxicidad, testigos negativos y positivos,

— criterios de recuento de los micronúcleos,

— relación dosis-efecto, si es posible,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 13. OTROS EFECTOS: MUTAGÉNESIS

ENSAYO DE MUTACIÓN REVERSIBLE EN *ESCHERICHIA COLI*

1. MÉTODO

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El sistema de reversión del triptofan de *E. coli (trp)* es un ensayo microbiano que permite medir la reversión $trp^- \rightarrow trp^+$ debida a sustancias químicas que causan sustituciones básicas 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 cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

El ensayo puede realizarse por los siguientes métodos:

i) método de preincubación;

ii) método de incorporación directa en el que las bacterias y la sustancia de ensayo se mezclan con Agar de superficie y se vierten en la superficie de una caja de Agar selectivo.

1.6.1. *Preparaciones*

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 estar expuestas a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de una mezcla de activación adecuada de enzimas hepáticas de mamífero (fracción postmitocondrial suplida de cofactores) preparada a partir de ratones o de ratas tratadas previamente con agentes inductores enzimáticos.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Cepas experimentales

Deben utilizarse tres cepas, a saber: 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 y 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 superficie adecuado.

1.6.2.3. Utilización de testigos positivos y negativos

Paralelamente se deben realizar ensayos con testigos no tratados y testigos con disolventes. También deben realizarse testigos positivos con los siguientes fines:

i) confirmar la sensibilidad de las cepas bacterianas. Pueden utilizarse el metilmetano sulfonado, el óxido de 4-nitroquinoleína o el etilnitrosourea como testigos positivos para los ensayos sin activación metabólica;

ii) garantizar la estabilidad 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. Cantidad de sustancia de ensayo por placa

Por lo menos, deben probarse 5 cantidades distintas de sustancia de ensayo con diferencias semilogarítmicas 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 superficie de fondo o por la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. Las sustancias químicas no tóxicas deben probarse hasta los 5 miligramos por placa antes de que se pueda considerar negativa la sustancia de ensayo.

1.6.2.5. Condiciones de incubación

Se incuban las placas durante 48 a 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 mililitros de cultivo bacteriano fresco a 2,0 mililitros de Agar de superficie. En los ensayos con activación metabólica se añade al Agar, 0,5 mililitros 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 superficie debe solidificarse y las placas se incuban a 37 °C durante 48 a 72 horas. Al término del período de incubación se cuentan las colonias revertidas en cada placa.

En el método de preincubación, se preincuban una mezcla compuesta por, la sustancia de ensayo, 0,1 mililitros de cultivo bacteriano fresco y una cantidad adecuada de mezcla de activación de enzimas hepáticas, o la misma cantidad de solución tampón, y luego se le añaden 2,0 mililitros de Agar de superficie. El resto del procedimiento es idéntico al del método de incorporación directa sobre placa.

En los dos métodos las placas se preparan 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 tipo, tanto para la sustancia de ensayo como para los testigos.

Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Los resultados deben evaluarse mediante los métodos estadísticos adecuados.

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— bacterias y cepa utilizada,

— condiciones experimentales: dosis, toxicidad, composición del medio, métodos de tratamiento (preincubación, incubación), mezcla de activación de enzimas hepáticas, sustancias de referencia, testigos negativos,

— recuento por placa, número medio de colonias revertidas por placa, desviación tipo, relación dosis/efecto, si es posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. **Evaluación e interpretación**

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

B. 14. OTROS EFECTOS: MUTAGÉNESIS

ENSAYO DE MUTACIÓN REVERSIBLE EN *SALMONELLA THYPHIMURIUM*

1. MÉTODOS

1.1. Introducción

Ver introducción general, parte B (punto A).

1.2. Definición

Ver introducción general, parte B (punto B).

1.3. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.4. Principio del método

El sistema de reversión de histidina (*his*) de *Salmonella thyphimurium* es un ensayo microbiano que permite medir la reversión $his^- \rightarrow his^+$ inducida por sustancias químicas causantes de sustituciones básicas o de mutaciones que desplazan el cuadro de lectura en el genoma del organismo.

Las bacterias se exponen a la sustancia de ensayo con y sin activación metabólica y se vierten en la superficie de un medio mínimo. Después de un período de incubación adecuado se cuenta el número de colonias revertidas y se las compara con el de las revertidas espontáneamente observado en un cultivo testigo, no tratado y/o en presencia del disolvente.

1.5. Criterios cualitativos

Ninguno.

1.6. Descripción del método

1.6.1. *Preparaciones*

1.6.1.1. Bacterias

Se cultivan dos cultivos frescos de bacterias a 37 °C hasta el final de la fase exponencial o hasta el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. La densidad celular aproximada debe ser de $10^8 — 10^9$ células por milímetro.

1.6.1.2. Activación metabólica

Las bacterias deben estar expuestas a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de una mezcla de activación adecuada de enzimas hepáticas de mamífero (fracción postmitocondrial suplida de cofactores) preparada a partir de ratones o de ratas tratados previamente con agentes inductores enzimáticos.

1.6.2. *Condiciones experimentales*

1.6.2.1. Cepas experimentales

Deberán utilizarse por lo menos cuatro cepas, TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100; pueden utilizarse otras cepas suplementarias, por ejemplo, la TA 1538.

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 superficie adecuado.

1.6.2.3. Utilización de testigos negativos y positivos

Paralelamente se deben realizar ensayos con testigos no tratados y testigos con disolventes.

También deben utilizarse testigos positivos con los siguientes fines:

i) confirmar la sensibilidad de las cepas bacterianas.

Para los ensayos sin activación metabólica pueden utilizarse los compuestos siguientes:

Cepa	*Sustancia*
TA 1535, TA 100	Azida de sodio
TA 1538, TA 98	2-nitrofluoreno
TA 1537	9-aminoacridina;

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 cantidades distintas de sustancia de ensayo con diferencias semilogarítmicas 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 superficie de fondo o por la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. Las sustancias químicas no tóxicas deben probarse hasta los 5 miligramos por placa antes de que se pueda considerar negativa la sustancia de ensayo.

1.6.2.5. Condiciones de incubación

Las placas se incuban durante 48 a 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 mililitros de cultivo bacteriano fresco a 2,0 mililitros de Agar de superficie. En los ensayos con activación metabólica, se añade al Agar, 0,5 mililitros 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 debe solidificarse y las placas se incuban a 37 °C durante 48 a 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 mililitros de cultivo bacteriano fresco y una cantidad adecuada de mezcla de activación de enzimas hepáticas, o la misma cantidad de solución tampón, y luego se le añaden 2,0 mililitros de Agar de superficie. El resto del procedimiento es idéntico al del método de incorporación directa sobre placa.

En los dos métodos las placas se preparan 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 tipo, tanto para la sustancia de ensayo como para los testigos.

Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Los resultados deberán evaluarse mediante los métodos estadísticos adecuados.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— bacterias y cepa utilizada,

— condiciones experimentales: dosis, toxicidad, composición del medio, métodos de tratamiento (preincubación, incubación), mezcla de activación de enzimas hepáticas, sustancias de referencia, testigos negativos,

— recuento por placa, número medio de colonias revertidas por placa, desviación tipo, relación dosis/efecto, si es posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. Evaluación e interpretación

Ver introducción general, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFÍA

Ver introducción general, parte B (punto D).

PARTE C: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD

C. 1. TOXICIDAD AGUDA EN PECES

1. MÉTODO

1.1. Introducción

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 vistas a elegir el método de ensayo más apropiado (estático, semiestático, dinámico), que permita garantizar concentraciones constantes satisfactorias de la sustancia de ensayo durante todo el período de ensayo.

Al proyectar el ensayo y al interpretar los resultados deberá tenerse en cuenta otro tipo de información suplementaria, por ejemplo, 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 toxicidad aguda es el efecto desfavorable, discernible, inducido en un organismo durante un corto plazo (días) de exposición a una sustancia dada.

En el presente ensayo, la toxicidad aguda viene expresada por la concentración letal media (CL_{50}), es decir, la concentración que, en el agua, causa la muerte del 50 % de un lote de peces sometidos a ensayo durante un período de exposición continuo que debe indicarse. Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (mg/l) y también en peso por peso (partes por millón).

1.3. Sustancias de referencia

Se podrá efectuar el 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

Se expone a los peces a la sustancia o sustancias de ensayo añadidas al agua, en un intervalo de concentraciones dado, durante un período mínimo de 48 horas, pero, preferentemente 96 horas. 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 observación.

1.5. Criterios cualitativos

La mortalidad de los testigos al término del experimento, no debe sobrepasar el 10 %.

La concentración de oxígeno debe ser superior al 60 % de la saturación, durante todo el tiempo que dure el ensayo.

El análisis, las propiedades químicas o el sistema de ensayo utilizado deberían poner de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo se mantiene de forma satisfactoria (por ejemplo, en los límites del 80 % de la concentración inicial, durante todo el ensayo).

1.6. **Descripción del método de ensayo**

Pueden utilizarse tres tipos de sistemas.

Ensayo estático:

Ensayo de toxicidad practicado en organismos acuáticos, durante el cual no se efectúa ninguna renovación de la solución de ensayo (las soluciones no se cambian durante todo el ensayo).

Ensayo semiestático:

Ensayo sin renovación continua de la solución, pero con una renovación periódica, si se prolonga la duración del ensayo (por ejemplo, cada 24 horas).

Ensayo dinámico:

Ensayo de toxicidad durante el cual se renueva constantemente el agua de los recipientes de ensayo. El agua contiene el producto químico sometido a ensayo a fin de que el medio de ensayo se vaya renovando.

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 soluciones madre para las sustancias de baja hidrosolubilidad, pueden prepararse por dispersión ultrasónica o, si es necesario, mediante disolventes orgánicos, emulsificantes o dispersantes. Cuando se utiliza este tipo de producto auxiliar, los peces testigo deben ser expuestos a una concentración de producto auxiliar igual a la concentración máxima de la sustancia de ensayo. La concentración de dichos productos auxiliares no deberá ser superior a 0,1 gramos por litro.

Las concentraciones elegidas para el ensayo se preparan mediante disolución de la sustancia madre. Si se procede a un ensayo con concentraciones elevadas, la sustancia puede disolverse directamente en el agua de disolución.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si se produjera un cambio significativo del pH, habría que repetir 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 disolución, salvo que haya razones concretas que lo impidan. Para ajustar el pH se usa, preferentemente, ClH o NaOH. Este ajuste 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 de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. Aguas para la cría y la disolución

Se podrá utilizar agua potable (no contaminada por concentraciones peligrosas de cloro, metales pesados u otras sustancias), agua natural de buena calidad o agua « reconstituida » (ver Apéndice 1). Se preferirán las aguas cuya dureza total esté comprendida entre 50 y 250 miligramos por litro (en CO_3Ca), con un pH de 6,0-8,5.

1.6.2. *Equipo*

El equipo debe ser de material químicamente inerte:

— sistema de disolución automática (para el ensayo dinámico),

— dispositivo para medir el oxígeno,

— equipo para determinar la dureza del agua,

— equipo apropiado para el control de la temperatura,

— pHmetro.

1.6.3. *Peces de experimentación*

Se pueden utilizar una o varias especies; su elección se deja al criterio del laboratorio que efectúe el ensayo.

Se recomienda que la especie se elija en función de criterios prácticos determinantes tales como: disponibilidad inmediata durante todo el año, fácil mantenimiento, aptitud para el ensayo, sensibilidad relativa, y todos los demás factores significativos económicos, biológicos o ecológicos. El pez debe tener buena salud y carecer de cualquier malformación aparente.

Las especies que se recomiendan para el ensayo figuran en el Apéndice 2.

1.6.3.1. Cría

Los peces que se sometan al ensayo deberán provenir preferentemente de un sólo lote, siendo cada individuo de la misma longitud y la misma edad. Deben mantenerse, al menos durante 12 días, en las siguientes condiciones,

— recipientes:

se recomienda un volumen de 300 litros como mínimo para los peces de agua fría y de 100 litros para los peces de agua caliente,

— agua:

variable, en función del sistema utilizado (recirculación o dinámico) y la especie de pez,

— luz:

fotoperíodo de 12 a 16 horas por día,

— concentración en oxígeno disuelto:

al menos 80 % de la saturación,

— alimentación:

diariamente o 3 veces por semana, interrumpida 24 horas antes de comenzar el ensayo.

1.6.3.2. Mortalidad

Registrar las mortalidades después de un período de adaptación de 48 horas. Juzgar la calidad del lote según los siguientes criterios:

— mortalidad al cabo de 7 días superior al 10 % de la población: se rechaza todo el lote,

— mortalidad al cabo de 7 días comprendida entre el 5 y el 10 % de la población: prolongar el período de observación 7 días más. Si no se comprueba ningún otro caso de mortalidad, se admite el lote, en caso contrario debe rechazarse,

— mortalidad en 7 días inferior al 5 % de la población: se admite el lote.

1.6.4. *Adaptación*

Los peces deben mantenerse en las condiciones de ensayo (agua y temperatura), durante al menos 7 días antes de su utilización.

1.6.5. *Procedimiento*

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 habrá que utilizar en el ensayo definitivo.

Efectuar un ensayo testigo, es decir, sin sustancia de ensayo, utilizando en su caso el producto auxiliar. Este ensayo testigo se añade a la serie de ensayos propiamente dichos.

Las concentraciones no deben disminuir en más de un 20 % durante el período de ensayo. Se elegirá un método estático, semiestático o dinámico, en función de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de ensayo.

El pez estará expuesto a la sustancia de ensayo en las siguientes condiciones,

— tiempo:

al menos 48 horas, pero preferentemente 96,

— número de organismos:

al menos 10 por concentración,

— recipientes:

de una capacidad apropiada, en función de la carga recomendada,

— carga biológica:

carga máxima recomendada para los ensayos estáticos y los semiestáticos: 1,0 gramos por litro; para los ensayos dinámicos se puede aceptar una carga más elevada,

— concentración de ensayo:

un testigo y al menos cinco concentraciones de ensayo que difieran por un factor constante no mayor de 1,8 y comprendidas en un intervalo de mortalidad de 0 % a 100 %,

— agua:

ver punto 1.6.1.2.,

— luz:

fotoperíodo de 12 a 16 horas por día,

— temperatura:

La conveniente a la especie elegida (ver anteriormente), pero aproximadamento a ± 1 °C, cualquiera que sea el sistema de ensayo,

— concentración en oxígeno disuelto:

al menos el 60 % de la saturación,

— alimento:

ninguno.

Los peces se observarán entre las 2 y 4 primeras horas y, al menos, a intervalos de 24 horas. Se considerarán muertos si al tocar el pedúnculo caudal no se produce reacción alguna y no se percibe ningún movimiento respiratorio. Los peces muertos se retiran en el momento de cada observación y se registra la mortalidad.

Se consignarán las anomalías visibles (por ejemplo, pérdida de equilibrio, natación, respiración, pigmentación, etc.).

Diariamente se medirá el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Registrar en papel log-Probit los porcentajes de mortalidad para cada período recomendado, en función de las concentraciones. Unir los puntos obtenidos y anotar la concentración correspondiente al 50 % de respuesta (ver figura en el Apéndice 3).

Se obtiene, así, la CL_{50} para el período de exposición apropiado.

Si los resultados lo permiten, puede estimarse la concentración letal media (CL_{50}) y sus límites de confianza (p 0,05) utilizando un método clásico.

El valor de la CL_{50} debe redondearse a una o, como máximo, dos cifras significativas.

Si la pendiente de la curva es demasiado acentuada para poder calcular la CL_{50}, bastará con proceder a una estimación gráfica de este valor.

Cuando dos concentraciones consecutivas, en una relación de 1,8, sólo den 0 o 100 % de mortalidad, bastarán estos dos valores para indicar el intervalo en que se sitúa la CL_{50}.

Si se comprueba que la estabilidad o la homogeneidad de la sustancia de ensayo no puede mantenerse, se mencionará en el informe y se interpretarán los resultados con prudencia.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— información acerca del organismo sometido a ensayo (nombre científico, cepa, proveedor, tratamiento previo eventual, tamaño y número utilizados en cada concentración de ensayo),

— la lista de las concentraciones utilizadas y cualquier información disponible sobre la estabilidad, en dichas concentraciones, de la sustancia de ensayo,

— la descripción del equipo de ensayo,

— si se realizan análisis químicos, los métodos utilizados y los resultados obtenidos,

— el origen del agua de disolución y sus principales características (pH, dureza, temperatura),

— eventualmente, las concentraciones de los productos auxiliares,

— en el caso de sustancias poco hidrosolubles, el método de preparación de la solución madre y de la solución de ensayo,

— los motivos de la elección y los detalles del método de ensayo utilizado (por ejemplo: duración del ensayo, sistema estático, semiestático, dinámico, tasa de renovación, aeración o no, carga de peces, etc.),

— información acerca de la iluminación,

— la concentración máxima aplicada que no haya causado mortalidad durante el ensayo,

— la concentración mínima aplicada que haya causado un 100 % de mortalidad durante el ensayo,

— la mortalidad acumulada para cada concentración y para el ensayo testigo (y, en su caso, el testigo con producto auxiliar) en los tiempos de observación recomendados,

— los valores de la CL_{50} en cada uno de los tiempos de observación recomendados (límites de confianza de 95 %, si es posible),

— los métodos estadísticos utilizados para determinar los valores de la CL_{50},

— la representación gráfica de los porcentajes de mortalidad en función de las concentraciones al final del ensayo,

— la pendiente de la curva y sus límites de confianza de 95 %,

— la concentración del oxígeno disuelto, el pH y la temperatura de las soluciones de ensayo cada 24 horas,

— si se utiliza una sustancia de referencia, su nombre y los resultados obtenidos,

— deberán respetarse los criterios cualitativos.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París 1981, Test Guidelines 203, Decision of the Council C (81) 30, Final.

Apéndice 1

Agua reconstituida

Ejemplo de agua de disolución idónea

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}.

Soluciones patrón

$Cl_2Ca \cdot 2H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado): 11,76 g

disolver en agua, completar hasta el litro.

$SO_4Mg \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): 4,93 g

disolver en agua, completar hasta el litro.

CO_3HNa (carbonato ácido de sodio): 2,59 g

disolver en agua, completar hasta el litro.

ClK (cloruro de potasio): 0,23 g

disolver en agua, completar hasta el litro.

Agua de disolución reconstituida

Mezclar 25 mililitros de cada una de las cuatro soluciones patrón y completar, hasta un litro, con agua.

Airear hasta la saturación en oxígeno disuelto.

El pH debe ser de 7,9 ± 0,3.

Si es necesario, ajustarlo con NaOH (hidróxido de sodio) o ClH (ácido clorhídrico).

El agua de disolución 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.

Las ocasionales desviaciones durante la preparación del agua de disolución no deben modificar su composición o sus propiedades.

Apéndice 2

Especies de peces recomendados para el ensayo

Especie recomendada	Intervalo de las temperaturas de ensayo recomendado (°C)	Longitud total recomendada del animal sometido al ensayo (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Pez cebra	20 a 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Fathead minnow) Pez cabeza gorda	20 a 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Carpa común	20 a 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) (Killifish) Medaka	20 a 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulate (Teleostei, Poesiliidae) (Petres 1859) (Guppy)	20 a 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Linneaus 1758) (Bluegill) Agallas azules	20 a 24	5,0 ± 2,0
Salmo gairdneri (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Trucha arcoiris	13 a 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Salons) (Linneaus 1758) (Ide melanote)o	20 a 24	6,0 ± 2,0

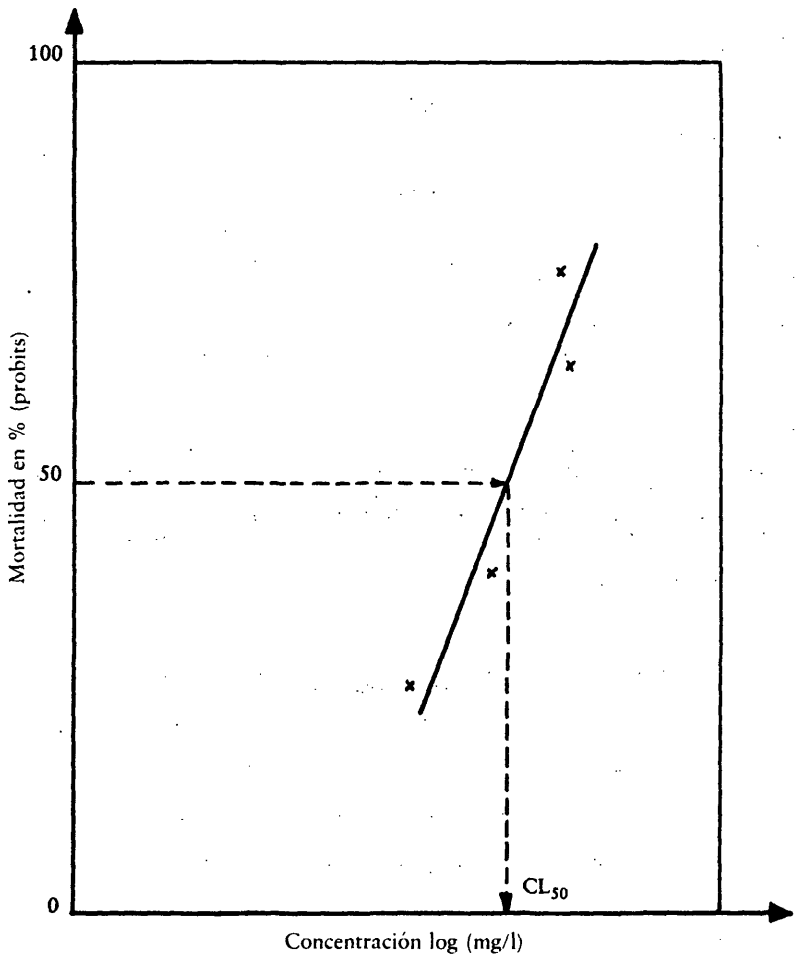
Aprovisionamiento

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. El animal que se someta al ensayo debe estar sano y su origen debe ser conocido. Estos peces están disponibles casi en todo el mundo.

Apéndice 3

Ejemplo de curva de porcentaje de mortalidad/concentración

Ejemplo de determinación de la CL_{50} un papel log-probit



Apéndice 4

Lista de algunos métodos estandar

(1) OCDE, París 1981, test guideline 203, Decision of the Council C (81) 30, Final.
(2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3 Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method Document 7436/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.
(3) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchung-methoden-Part II, 1974.
(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen. 38 412 (L1), L (15).
(5) AFNOR. Determinación de la toxicidad aguda de una sustancia respecto a la *Brachydanic rerio*. T90-303.
(6) JIS K 0102. Acute toxicity test for fish.
(7) Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment, Volume I and II, Gobernment Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.
(8) Environmental Protection Agency 1975. Methods for the Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Test with Aquatic Organisms. Ecological Research Series EPA-660-75-009.
(9) Environmental Protection Agency. January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development EPA-600/4-78-012.
(10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, March 16 1979, Parte IV.
(11) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater 14th edition 1975 APHA-AWWA-WPCF.
(12) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.
(13) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for Evaluating dose Effects Experiments, J. Pharm. Exp. Therap., Vol. 96, 1949, p. 99.

C. 2. TOXICIDAD AGUDA EN DAFNIAS

1. MÉTODO

1.1. Introducción

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, antes de proceder al ensayo.

Al proyectar el ensayo y al interpretar los resultados deberá tenerse en cuenta otro tipo de información suplementaria (por ejemplo, la fórmula desarrollada, 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

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 el presente método de ensayo.

En el presente ensayo, la toxicidad aguda viene expresada por la concentración media efectiva (CE_{50}) de inmovilización, es decir, la concentración (en valor inicial) que inhibe la movilidad del 50 % de las dafnias de un lote sometido al ensayo durante un período de exposición de 24 horas. La CE_{50} a las 48 horas también puede determinarse, si es factible. Las concentraciones, de la sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (mg/l) y, también, en peso por peso (partes por millón).

Inmovilización:

Se consideran inmovilizados los organismos que son incapaces de desplazarse durante los 15 segundos siguientes a una ligera agitación del recipiente.

Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso por peso (partes por millón).

1.3. Sustancias de referencia

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia para demostrar que, en las condiciones experimentales de laboratorio, la sensibilidad de la cepa utilizada no se ha modificado sensiblemente.

En condiciones de ensayo idénticas, para un intervalo de concentraciones eficaces, concentraciones diferentes en sustancias de ensayo ejercen efectos diferentes en la movilidad de las dafnias. En consecuencia, al final del ensayo, a cada concentración corresponderá un porcentaje diferente de inmovilización de las dafnias.

Las concentraciones que causan del 0 al 100 % de inmovilizaciones se determinan directamente mediante la observación, mientras que la CE_{50}-24 horas (así como la CE_{50}-48 horas) se determina, si es factible, por cálculo.

Para este método, se utilizará un sistema estático, sin renovar las soluciones de ensayo durante el período de exposición.

1.5. Criterios cualitativos

La inmovilización de los testigos, al final del ensayo, no debe exceder del 10 %.

La concentración en oxígeno al final del ensayo no debe ser inferior a 2 miligramos por litro.

Las dafnias no deberían ser arrastradas hacia la superficie del agua, al menos en el testigo.

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 el agua desionizada o en el agua que responda a las condiciones establecidas en el punto 1.6.1.2.

Las soluciones madre para las sustancia de baja hidrosolubilidad, pueden prepararse por dispersión ultrasónica o, si es necesario, utilizando disolventes orgánicos, emulsificantes o dispersantes. Si se recurre a dichas sustancias, las dafnias testigo deben ser expuestas a una concentración de producto auxiliar igual a la concentración máxima de la sustancia de ensayo. La concentración de dichos productos auxiliares no debe sobrepasar los 0,1 gramos por litro.

Las concentraciones elegidas para el ensayo se preparan mediante disolución de la solución madre. Si se procede a un ensayo con concentraciones elevadas, la sustancia puede disolverse directamente en el agua de disolución.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. En caso de modificaciones significativas del pH, es conveniente repetir el ensayo ajustando el pH y registrar los resultados. En tal caso, el valor del pH de la solución patrón 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, ClH o NaOH. Este ajuste debe efectuarse de tal forma que no se modifique sensiblemente la concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre. Si el ajuste provoca una reacción química o una precipitación de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. Aguas para la cría y la disolución

Para este ensayo puede utilizarse cualquier tipo de agua natural o reconstituida que sea conveniente para la cría de dafnias.

Para evitar tener que proceder a adaptaciones antes del ensayo, se recomienda utilizar para la cría la misma 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 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 experimentación*

Daphnia magna o *Daphnia pulex,* con más de 6 horas y menos de 24 horas al comienzo del ensayo, criada en laboratorio, sin enfermedades y 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 intervalo de concentraciones que hay que utilizar en el ensayo definitivo. Además de las series de ensayos, debe efectuarse un ensayo testigo, realizado con los productos auxiliares pero en ausencia de la sustancia de ensayo.

Las dafnias se exponen a la sustancia de ensayo en las siguientes condiciones,

— tiempo:

al menos 24 horas,

— número de organismos:

al menos 20 organismos por concentración de ensayo, repartidos preferentemente en lotes de 5 o en 2 lotes de 10,

— carga biológica:

un mínimo de 2 mililitros de solución para cada organismo,

— concentración de ensayo:

la solución de ensayo debe prepararse inmediatamente antes de introducir a las dafnias, preferentemente sin utilizar más disolvente el agua. Al mismo tiempo que el testigo, hay que someter al ensayo concentraciones que formen una serie geométrica, con una relación 1,8 que permitan obtener 0 y 100 % de inmovilizaciones después de 24 horas y una serie de inmovilizaciones intermedias que permitan calcular la CE_{50}-24 horas,

— agua:

ver punto 1.6.1.2.,

— luz:

es facultativo un fotoperíodo; se puede admitir la obscuridad completa,

— temperatura:

la temperatura de ensayo debe situarse entre 18 y 22°C, pero debe ser constante para cada ensayo con una aproximación de ± 1°C,

— aeración:

no airear por burbujeo,

— alimento:

ninguno.

Al final del ensayo deberá medirse el pH y la concentración en oxígeno de los testigos y de todas las concentraciones de ensayo; el pH de las soluciones no debería haberse modificado.

Las sustancias volátiles deben someterse a ensayo en recipientes llenos y herméticamente cerrados, suficientemente grandes como para evitar la falta de oxígeno.

Se observa las dafnias al menos después de 24 horas de exposición y de nuevo después de 48 horas, si se ha prolongado el ensayo.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Registrar en papel log-Probit los porcentajes de inmovilización acumulados en función de las concentraciones, después de una exposición mínima de 24 horas. Unir los puntos obtenidos y anotar la concentración correspondiente a 50 % de inmovilización.

Si los resultados lo permiten, puede estimarse la concentración media CE_{50} y sus límites de confianza (p :0,05) utilizando un método clásico.

El valor de la CE_{50} debe redondearse a una o, como máximo, dos cifras significativas.

Si la pendiente de la curva es demasiado acentuada para poder calcular la CE_{50}, bastará con dar una estimación gráfica de dicho valor.

Cuando dos concentraciones consecutivas, en una relación de 1,8, sólo den 0 o 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, será conveniente interpretar los resultados con prudencia e indicarlo en el informe.

3. INFORME

Se procurará incluir lo siguiente:

— información acerca del organismo sometido a ensayo (nombre científicio, especie, proveedor u origen, tratamiento previo eventual, método de cría, incluida la cepa, naturaleza, cantidad y frecuencia de la alimentación),

el número de dafnias utilizado en cada concentración de ensayo,

— las concentraciones utilizadas y cualquier información disponible sobre la estabilidad, en dichas concentraciones, de las sustancias de ensayo en la solución de ensayo,

— la descripción de los recipientes utilizados en el ensayo: volumen de la solución contenida en cada uno de ellos, número de organismos,

— si se han realizado análisis químicos, los métodos utilizados y los resultados obtenidos,

— el origen del agua de disolución y sus principales características,

— el método de preparación de las soluciones madre y de las soluciones de ensayo,

— las concentraciones de cualquier producto auxiliar utilizado (disolventes orgánicos, dispersantes, etc.),

— información acerca de la iluminación,

— la concentración máxima aplicada que no haya provocado ninguna inmovilización durante el período de ensayo,

— la concentración mínima aplicada que haya provocado un 100 % de inmovilización durante el período de ensayo,

— los porcentajes de inmovilización acumulados en el ensayo testigo, en el ensayo testigo con producto auxiliar y en cada concentración de ensayo, para los períodos de observación recomendados (24 horas o 24 y 48 horas),

— los valores de CE_{50} para cada período de observación recomendado (con un límite de confianza de 95 %, si es posible),

— la representación gráfica de los porcentajes de inmovilización en función de las concentraciones al final del ensayo,

— los métodos estadísticos utilizados para determinar los valores de la CE_{50},

— la pendiente de la curva al cabo de 24 horas y sus límites de confianza de 95 %,

— la concentración del oxígeno disuelto, los valores del pH y la temperatura de las soluciones de ensayo,

— si se utiliza una sustancia de referencia, su nombre y los resultados obtenidos,

— deberán respetarse los criterios cualitativos.

3. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C (81) 30, Final.

(2) ISO Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus *(Cladocera crustacea)* ISO/6341.

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus *(Cladocera crustacea)* NFT 90 301.

(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1), (L11).

Apéndice 1

Agua reconstituida

Ejemplo de agua de disolución idónea

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}.

Soluciones principales

$Cl_2Ca \cdot 2H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado): 11,76 g
disolver en agua, completar hasta el litro.

$SO_4Mg \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): 4,93 g
disolver en agua, completar hasta el litro.

CO_3HNa (carbonato ácido de sodio): 2,59 g
disolver en agua, completar hasta el litro.

ClK (cloruro de potasio): 0,23 g
disolver en agua, completar hasta el litro.

Agua de disolución reconstituida

Mezclar 25 mililitros de cada una de las cuatro soluciones patrón y completar, hasta un litro, con agua.

Airear hasta la saturación en oxígeno disuelto.

El pH debe ser de 7,9 ± 0,3.

Si es necesario, ajustarlo con NaOH (hidróxido de sodio) o ClH (ácido clorhídrico).

El agua de disolución 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.

Las ocasionales desviaciones durante la preparación del agua de disolución no deben modificar su composición o sus propiedades.

C.3. DEGRADACIÓN BIÓTICA:

SCREENING TEST DE LA OCDE MODIFICADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método es medir la biodegradabilidad, en medio acuoso aeróbico, de compuestos orgánicos, no volátiles e hidrosolubles, con una concentración inicial correspondiente de 5 a 40 miligramos de carbono orgánico disuelto (COD) por litro. Si se mejoraran los límites de sensibilidad de los analizadores de carbono orgánico sería aconsejable, especialmente en el caso de los compuestos tóxicos, utilizar concentraciones de ensayo más bajas. Es conveniente determinar previamente el contenido en carbono orgánico de la sustancia de ensayo.

El método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas que, a la concentración de ensayo (5 a 40 mg de COD/1):

— son solubles en el agua,

— tienen una presión de vapor despreciable,

— no tienen efecto inhibidor sobre las bacterias,

— no sufren una adsorción importante en las superficies de vidrio.

Para interpretar los resultados es útil conocer las proporciones relativas de los principales elementos constitutivos de la sustancia de ensayo, especialmente cuando los resultados obtenidos sean bajos o poco significativos.

Es conveniente conocer la toxicidad de la sustancia sobre los microorganismos para poder interpretar los resultados bajos y para elegir las concentraciones de ensayo apropiadas.

1.2. Definiciones y unidades

La degradación se define como el porcentaje de pérdida de COD en relación a su valor inicial.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

donde:

D_t = degradación en porcentaje de pérdida de COD, en el tiempo t

C_o = concentración inicial en COD del medio de cultivo (mg de COD por litro)

C_t = concentración en COD del medio de cultivo en el tiempo t (mg de COD por litro)

$C_{bl(O)}$ = concentración inicial en COD del blanco (mg de COD por litro)

$C_{bl(t)}$ = concentración en COD del blanco, en el tiempo t (mg de COD por litro).

1.3. Sustancias de referencia

Es conveniente utilizar sustancias de referencia apropiadas para verificar la actividad del inóculo. A tal efecto se puede utilizar, por ejemplo, anilina, acetato de sodio o benzoato de sodio. La degradación de dichas sustancias debe ser superior o igual al 70 % en 10 días, a contar desde el día en que se observe, por primera vez, una tasa de biodegradación superior al 10 %. Para que el ensayo sea válido estos resultados deben obtenerse en un plazo de 28 días. En caso contrario, debería repetirse utilizando un inóculo de origen diferente.

1.4. **Principio del método de ensayo**

Se disuelve en un medio mineral (solución de nutrientes minerales, enriquecida con oligoelementos y una solución de vitaminas esenciales) una cantidad definida de sustancia de forma que se obtenga una concentración correspondiente a 5 a 40 miligramos de COD por litro. A continuación, esta solución se inocula con un número pequeño de microorganismos de un cultivo mixto, se la airea de 20 a 25°C y se la mantiene en la obscuridad o con luz difusa.

La degradación se sigue mediante determinaciones del COD durante un período de 28 días.

El ensayo se controla con una sustancia de referencia.

Paralelamente se efectuarán « pruebas en blanco » que no contengan ni sustancia de ensayo ni sustancia de referencia, para determinar las concentraciones en COD de los medios.

1.5. **Criterios cualitativos**

La reproducibilidad del método se ha establecido a partir del ensayo de intercalibración de la CEE y de la OCDE.

La concentración más baja de la sustancia de ensayo para la que se puede aplicar el método la determina, en gran medida, el límite de detección del análisis del carbono orgánico (0,5 mg C/1, actualmente) y su concentración en la solución nutritiva.

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. Agua

Generalmente se utilizan como disolventes agua desionizada o agua destilada libres de sustancias tóxicas (en particular, cobre). Se aconseja utilizar agua desionizada por destilación o por intercambio de iones.

El agua destilada no debe contener más del 10 % del carbono orgánico aportado por la sustancia de ensayo.

Para el análisis del COD en concentraciones comprendidas entre 0 y 40 miligramos por litro es indispensable un agua de gran pureza. Las contaminaciones pueden provenir no sólo de las impurezas contenidas en el agua sino también de las resinas intercambiadoras de iones y de proliferaciones microbianas (bacterias o algas que se desarrollan por la acción de la luz, etc.). Debe utilizarse un mismo lote de agua para una serie de ensayos y controlar previamente el agua analizando el COD. Si es necesario, puede purificarse con irradiaciones UV o por otros medios.

1.6.1.2. Solución nutritiva

La solución nutritiva contiene, por litro, 1 mililitro de cada una de las siguientes soluciones, a) a f), en agua (1.6.1.1.) (las iniciales PA significan « pureza analítica).

a) PO_4KH_2 (fosfato monopotásico): PA 8,50 g
PO_4K_2H (fosfato dipotásico): PA 21,75 g
$PO_4Na_2H \cdot 2H_2O$ (fosfato disódico dihidratado): PA 33,40 g
$ClNH_4$ (cloruro de amonio): PA 20,00 g
disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1.).
El pH debe ser de 7,2.

b) $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): PA 22,50 g
disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).

c) Cl_2Ca (cloruro de calcio): PA 27,50 g
disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).
Esta solución debe prepararse justo antes del ensayo.

d) $Cl_3Fe \cdot 6H_2O$ (cloruro de hierro (III) hexahidratado): PA 0,25 g
disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).
Esta solución debe prepararse justo antes del ensayo.

e) Solución de oligoelementos
$SO_4Mn \cdot 4H_2O$ (sulfato de manganeso (II) tetrahidratado) (= 30,23 mg $SO_4Mn \cdot H_2O$): PA 39,9 mg
BO_3H_3 (ácido bórico): PA 57,2 mg
$SOZ_n \cdot 7HO$ (sulfato de zinc heptahidratado): PA 42,8 mg
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6$ (heptamolibdato de amonio (IV)) (= 36,85 mg $Mo_7O_{24}(NH_4)_6.4H_2O$): PA 34,7 mg
Fe-quelatoda: (Cl_3Fe EDTA) PA 100,0 mg
disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).
Esterilización de la solución madre de oligoelementos a 120°C, bajo 2 atmósferas, durante 20 minutos.

f) Solución de vitaminas
Biotina: PA 0,2 mg
Ácido nicotínico: PA 2,0 mg
Tiamina: PA 1,0 mg
Ácido p-aminobenzoico: PA 1,0 mg
Ácido pantoténico: PA 1,0 mg
Piridoxamina: PA 5,0 mg
Cianocobalamina: PA 2,0 mg
Ácido fólico: PA 5,0 mg
disolver y completar hasta 100 ml con agua (1.6.1.1).

La solución se pasa por filtros de membrana esterilizada de 0,2 micrómetros. En lugar de la solución 1.6.1.2. (f) se puede utilizar 15 mg de extracto de levadura disuelto en 100 mililitros de agua (1.6.1.1).

1.6.1.3. Sustancias de referencia

Anilina (recién destilada), acetato de sodio, benzoato de sodio.

1.6.1.4. Solución de cloruro mercúrico

1 % de Cl_2Hg en el agua (1.6.1.1).

1.6.2. *Equipo*

1.6.2.1. Incubador de cultivo con agitación que pueda acoger a matraces

Erlenmeyer de 2 litros, con regulación automática de la temperatura o situado en un recinto con termostato a 20-25°C.

1.6.2.2. Matraces Erlenmeyer de 2 litros con cuello estrecho. Antes de usarlos se deben limpiar cuidadosamente con ácido clorhídrico en solución alcohólica, enjuagar y secar para eliminar todos los residuos de ensayos anteriores. Aunque sean nuevos debe limpiarse de la misma forma para evitar el riesgo de contaminación.

1.6.2.3. Dispositivo de filtración por membrana

1.6.2.4. Filtros de membrana de 0,2 micrómetros

1.6.2.5. Analizador de carbono

1.6.3. *Preparación del inóculo*

La inoculación puede efectuarse a partir de cualquiera de las cuatro fuentes que se indican a continuación, siempre que su validez se compruebe con una sustancia de referencia (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inóculo a base de un efluente secundario

Es preferible elegir un efluente secundario de buena calidad, procedente de una instalación que trate específicamente aguas domésticas. El efluente debe airearse desde su extracción hasta su utilización. Se pasa por un filtro basto y se descartan los primeros 200 mililitros. El filtrado, convenientemente aireado, debe utilizarse el mismo día.

1.6.3.2. Inóculo a base de suelos

Se ponen en suspensión 100 gramos de suelo (fértil, no estéril) en 1 000 mililitros de agua potable sin cloro (los suelos con gran contenido en arcilla, arena o carbono orgánico no pueden utilizarse). Después de agitar, conviene dejar reposar la suspensión durante 30 minutos.

El sobrenadante se pasa entonces por un papel filtro grueso y se descartan los 200 primeros mililitros. El filtrado se airea inmediatamente, continuando la aeración hasta su utilización; este inóculo debe emplearse el mismo día.

1.6.3.3. Inóculo a base de aguas superficiales

Se pasa una muestra de agua superficial por un papel filtro grueso y se descartan los primeros 200 mililitros. El filtrado, convenientemente aireado hasta su utilización, debe emplearse el mismo día.

1.6.3.4. Inóculo mixto

Se prepara mezclando convenientemente volúmenes iguales de los tres tipos de inóculos anteriormente descritos.

La validez del inóculo se verifica con una sustancia de referencia (1.6.1.3).

1.6.4. *Procedimiento*

Las sustancias de ensayo y la sustancia de referencia se someten respectivamente a ensayos por duplicado y a un ensayo en blanco. Los ensayos en blanco se realizan con inoculación, pero sin añadir sustancia de ensayo ni de referencia.

Se prepara una solución madre de la sustancia de ensayo en el agua (1.6.1.1). Se añade a la solución nutritiva (1.6.1.2) una cantidad de esta solución madre que permita obtener una concentración de 5 a 40 miligramos de COD por litro. La sustancia de referencia (1.6.1.3) debe someterse a ensayo en la concentración inical de 20 miligramos de COD por litro.

En cada uno de los dos recipientes (1.6.2.2) se vierten 900 mililitros de medio nutritivo, así preparado, y se inocula con 0,5 mililitros de inóculo (1.6.3.). Se cubren los recipientes con una hoja de aluminio (por ejemplo) procurando no perturbar los intercambios gaseosos entre el recipiente y la atmósfera que le rodea (el algodón no puede utilizarse a causa del análisis del COD). Los recipientes se introducen a continuación en el agitador, manteniéndolo a una temperatura constante de 20 a 25°C durante todo el ensayo y resguardado de la luz. El aire ambiente debe carecer de contaminantes y de sustancias tóxicas (disolventes clorados, etc.).

Durante el ensayo de biodegradación se procederá a una determinación por duplicado de las concentraciones en COD, el primer día y los días vigésimo séptimo y vigésimo octavo. Deberán efectuarse al menos tres análisis suplementarios (en torno a los días séptimo, decimocuarto y vigésimoprimero) para seguir la evolución de la degradación.

Para efectuar cada determinación sólo hay que extraer el volumen estrictamente necesario. La centrifugación o la filtración con membrana, previas a la determinación del carbono, exigen volúmenes diferentes según los equipos. Las pérdidas debidas a la evaporación del medio de cultivo deben corregirse añadiendo la cantidad de agua necesaria (1.6.1.1).

Antes de cada toma, debe agitarse cuidadosamente el medio y disolver o poner en suspensión las partículas que se adhieran a las paredes del recipiente. Las muestras centrifugades o filtradas deben

analizarse el mismo día; si no, es preciso añadirles 0,05 mililitros de la solución de Cl_2Hg (1.6.1.4) por cada 10 mililitros de medio, o bien consevarlas entre 2 y 4°C hasta las 24 horas, o por debajo de 18°C para períodos más largos.

Si se observa una meseta en la gráfica de biodegradación antes del vigésimoctavo día, el ensayo puede considerarse terminado. Si la degradación ha comenzado perceptiblemente antes del vigésimoctavo día sin llegar a alcanzar una meseta, es conveniente prolongar el ensayo durante una o dos semanas.

Todas estas operaciones exigen mucha atención y los recipientes, pipetas, etc., deben estar muy limpios (aunque no estériles).

1.6.5. *Determinación del COD*

Los filtros de membrana son apropiados si previamente se ha comprobado que no liberan carbono y que no absorven la sustancia de ensayo durante la filtración.

Si se centrifugan las muestras hay que realizar la operación a 40 000 ms^{-2} (alrededor de 4 000 g) preferentemente a una centrífuga refrigerada, en cualquier caso, a menos de 40°C.

Nota

En concentraciones muy bajas, parece que la diferenciación COT:COD por centrifugación no es satisfactoria, bien, porque no se han eliminado todas las bacterias, o bien porque se ha vuelto a disolver el carbono del citoplasma bacteriano. En concentraciones más elevadas ($\geq$ 10 mg/l) el error de centrifugado, para una inoculación idéntica, parece comparativamente pequeño.

La muestra extraída (alrededor de 30 ml) se centrifuga inmediatamente o se pasa por un filtro de membrana mediante el dispositivo de filtración (1.6.2.3) utilizando filtros de membrana tratados, según se indica en el punto 1.6.2.4. Se descartan los 20 primeros mililitros del filtrado.

La concentración en COD del filtrado que queda (alrededor de 10 ml) se determina por duplicado con ayuda del analizador de carbono (1.6.2.5). Si el filtrado no puede analizarse el mismo día, debe conservarse tal y como se indica en el punto 1.6.4.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las determinaciones se registrarán según el modelo adjunto (Apéndice 1) y los valores de la biodegradación se calcularán de acuerdo con el punto 1.2.

Las concentraciones en COD se redondean al 0,1 mg por litro más próximo, y los valores medios de D_t al porcentaje más próximo.

El desarrollo del ensayo de degradación se representa gráficamente en un diagrama del cual se adjunta un modelo (Apéndice 2).

Los resultados del ensayo de degradación son válidos si, en la misma serie de ensayos, la sustancia de referencia muestra un porcentaje de eliminación de COD $\geq$ al 70 % en 10 días, a contar desde el día en que, por primera vez, la tasa de biodegradación observada sobrepase el 10 %. Este resultado debe obtenerse dentro del plazo de 28 días de duración del ensayo, si no, hay que eliminar toda la serie.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— los resultados, reportados según el formulario adjunto (Apéndice 1),

— el desarrollo del ensayo de degradación representado en un diagrama que indique la fase de estado latente, la fase de degradación, la pendiente de la curva, el intervalo de tiempo. (El « intervalo de tiempo » significa aquí un período de 10 días que comienza el día en que por, primera vez, el nivel de biodegradabilidad observado sobrepase el 10 %),

— las pruebas de validez del ensayo (disminución en COD de la sustancia de referencia ≥ al 70 % en 10 días, a contar desde el día en que la degradación sobrepasa el 10 %, debiéndose obtener este resultado dentro del plazo de 28 días, es decir dentro del período de duración del ensayo).

3.2. **Interpretación de los resultados**

Siendo este ensayo tan riguroso, un resultado bajo no significa, necesariamente, que la sustancia sometida a ensayo no sea biodegradable en condiciones ambientales; simplemente indica que son necesarios estudios complementarios para comprobarlo.

Las sustancias sometidas a ensayo que muestren un nivel de biodegradación elevado durante el ensayo, se considerarán fácilmente degradables, si dicho nivel se ha alcanzado, como máximo, a los 10 días de haberse sobrepasado, por primera vez, el 10 %.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, Paris 1981, Test Guideline 301E. Decision of the Council C (81) 30, Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, Nº2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, Nº1, 1981, p. 45-55.

Apéndice 1

Degradación biótica: screening test de la OCDE modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: .....

Sustancia de ensayo: .....

Experimento nº: .....

Resultados del ensayo

Concentración teórica: ..... mg/l COD

Determinación del carbono

	Matraz nº		Concentración en COD después de × dias (mg/l)							
			0 (C_0)							
Ensayo: Solución nutritiva mineral con sustancia de ensayo e inoculación	1	a_1								
		a_2								
		$C_{at} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b_1								
		b_2								
		$C_{at} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
Blanco: Solución nutritiva mineral sin sustancia de ensayo pero con inoculación	3	bl_1								
		bl_2								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Evaluación de los resultados brutos

Matraz nº	Cálculo de los resultados	% de pérdida en COD después × dias							
		0							
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{at} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{at} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
Media (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) No se establecerá la media entre D_1 y D_2 en caso de diferencia importante entre ambos.

Degradación biótica: screening test de la OCDE modificado (Formulario)

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: .....

Responsable del ensayo: .....

Fecha de inicio del ensayo: ..... Experimento nº .....

Sustancia de ensayo: .....

Estructura química: .....

Solución-madre:

	mg/l	mg/l COT (*)	mg/l COD (**)
Concentración de la sustancia de ensayo			

(*) Una diferencia de los valores COD y COT indica una solubilidad insuficiente de la sustancia sometida a ensayo.
(**) Todos los valores COD se determinan después de pasar por un filtro de membrana o de centrifugar.

Analizador de carbono: .....

Inóculo: .....

Resultado del ensayo:

D_t = ... % de pérdida en COD después de ..... días.

Comprobación del resultado: .....

Sustancia de referencia: .....

Resultado: ..... % de pérdida en COD después de ..... días.

Experimento de referencia nº .....

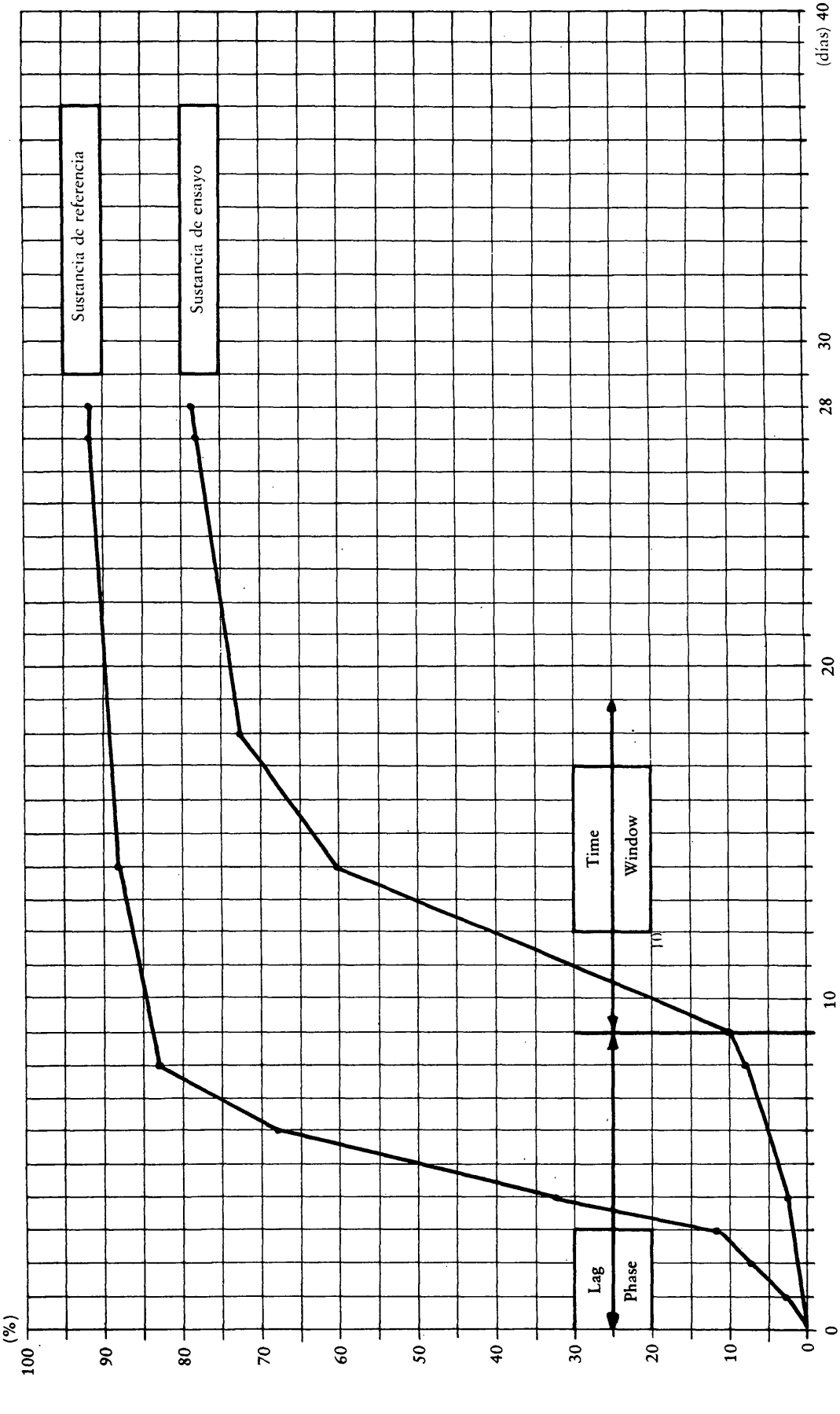
Observaciones:

....
(Fecha) (Firma)

Apéndice 2

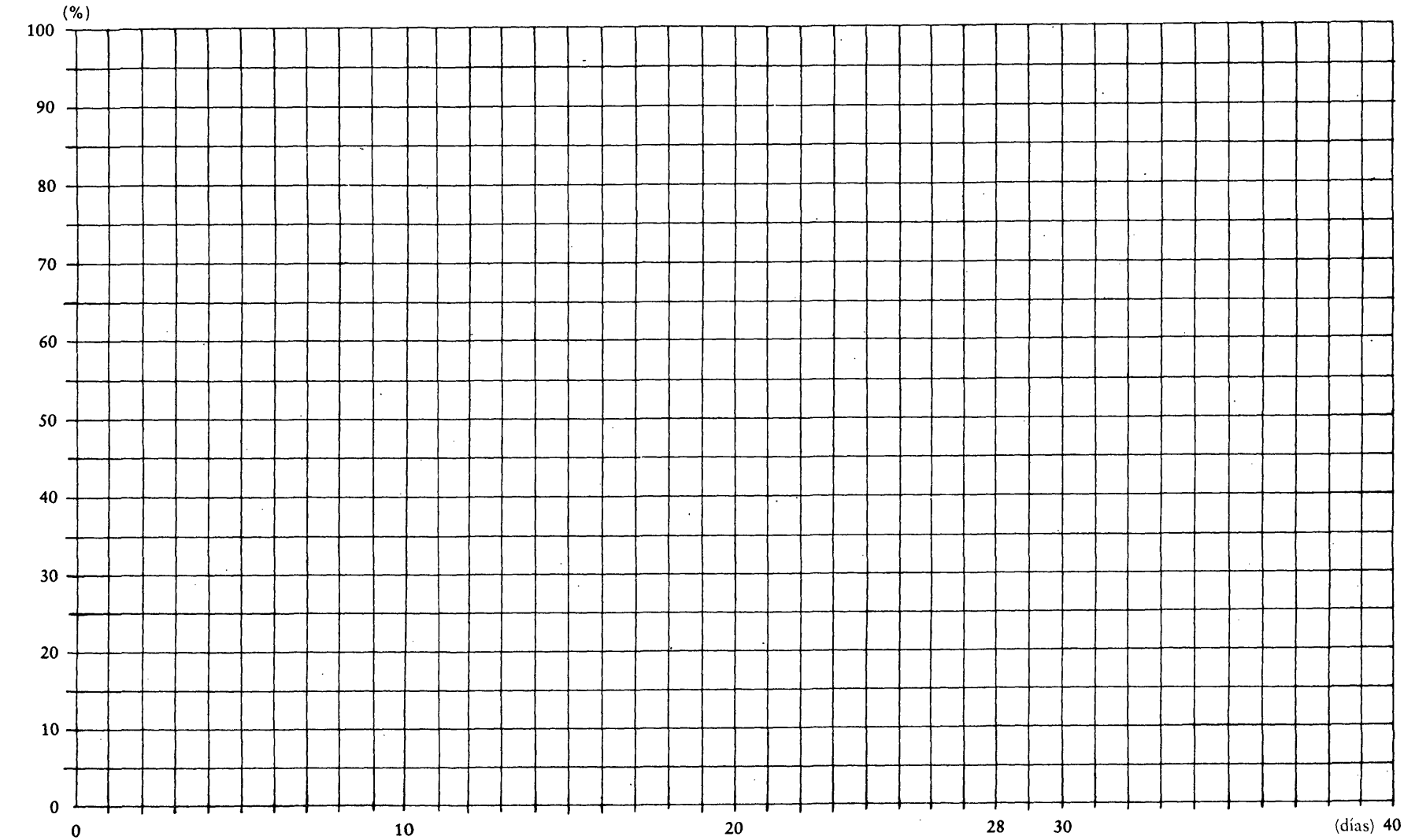
Screening test de la OCDE modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



Screening test de la OCDE modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo:..... Experimento nº: .....



C.4. DEGRADACIÓN BIÓTICA:

ENSAYO AFNOR NF T 90/302 MODIFICADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método es medir la biodegradabilidad, en medio acuoso aeróbico, de compuestos orgánicos, no volátiles e hidrosolubles, con una concentración inicial correspondiente a 40 miligramos de carbono orgánico disuelto (COD) por litro. Si se mejoraran los límites de sensibilidad de los analizadores de carbono orgánico, sería aconsejable, especialmente en el caso de los compuestos tóxicos, utilizar concentraciones de ensayo más bajas.

Es conveniente determinar previamente el contenido en carbono orgánico de la sustancia de ensayo.

El método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas que, a la concentración de ensayo (40 mg COD/l):

— son solubles en el agua,

— tienen una presión de vapor despreciable,

— no tienen efectos inhibidores sobre las bacterias,

— no sufren una absorción importante en las superficies de vidrio.

Para interpretar los resultados, es útil conocer las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de ensayo, especialmente cuando los resultados obtenidos sean bajos o poco significativos.

Es conveniente conocer la toxicidad de la sustancia química en los microorganismos para interpretar los resultados bajos.

1.2. Definición y unidades

La degradación se define como el porcentaje de pérdida de COD en relación a su valor inicial:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

donde:

D_t = degradación, en porcentaje de pérdida de COD en el tiempo t,
C_O = concentración inicial en COD del medio de cultivo (mg de COD/l).
C_t = concentración en COD del medio de cultivo en el tiempo t (mg de COD/l),
$C_{bl(O)}$ = concentración inicial en COD del blanco (mg de COD/l),
$C_{bl(t)}$ = concentración en COD del blanco en el tiempo t (mg de COD/l).

1.3. Sustancias de referencia

Es conveniente verificar el inóculo con sustancias químicas de referencia apropiadas.

A tal efecto se puede utilizar la anilina, el acetato de sodio o en benzoato de sodio (por ejemplo), con los que se deberá observar una eliminación del contenido en COD igual o superior al 70 % en 28 días; sino el ensayo se considerará nulo y deberá comenzarse de nuevo utilizando un inóculo procedente de otra fuente.

En este método de ensayo específico, la glucosa se utiliza especialmente para el ensayo de inhibición y para comprobar la actividad del inóculo, pero también puede utilizarse la anilina, el acetato de sodio o el benzoato de sodio.

1.4. **Principio del método de ensayo**

Las sustancias disueltas en el agua son biodegradadas por microorganismos quimiorganótrofos, que las utilizan como únicas fuentes de carbono y de energía. Estas sustancias se estudian en una concentración en la que el contenido inicial de carbono orgánico es igual a 40 miligramos por litro. El carbono orgánico que queda en solución se mide al menos después de 3, 7, 14 y 28 días. Simultáneamente, se estudian los efectos inhibidores eventuales de la sustancia de ensayo en el inóculo. El procedimiento se controla por medio de una sustancia de referencia.

1.5. **Criterios cualitativos**

La reproducibilidad del método se ha establecido a partir del ensayo de intercalibración de la CEE y de la OCDE.

La concentración más baja de la sustancia de ensayo para la que se puede aplicar este método de ensayo depende, en gran medida, del límite de sensibilidad del análisis del carbono orgánico que es, actualmente, de 0,5 miligramos de C por litro, y de la concentración de carbono orgánico disuelto en la solución nutritiva.

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Reactivos*

Los productos químicos deben ser de pureza analítica.

1.6.1.1. Agua destilada

El agua destilada no debe contener más del 10 % del carbono orgánico aportado por la sustancia de ensayo.

1.6.1.2. Solución nutritiva

Preparar el medio de ensayo como se indica a continuación, utilizando material estéril. Para 1 litro de solución, disolver en agua destilada (PA = pureza analítica):

$SO_4(NH_4)_2$ (sulfato de amonio):	PA 0,300 g
NO_3NH_4 (nitrato de amonio):	PA 0,150 g
PO_4KH_2 (fosfato monopotásico):	PA 0,300 g
$PO_4Na_2H \cdot 12H_2O$ (fosfato disódico dodecahidratado):	PA 2,000 g
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado):	PA 0,050 g
$Cl_2Ca \cdot 2H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado):	PA 0,050 g
Extracto de levadura:	PA 0,005 g

El pH es de 7,5 ± 0,1.

Añadir 1 mililitro de la solución de oligoelementos de la composición siguiente:

$SO_4Fe \cdot 7H_2O$ (sulfato de hierro II heptahidratado):	PA 0,100 g
$SO_4Mn \cdot H_2O$ (sulfato de manganeso (II) monohidratado):	PA 0,100 g
MoO_4K_2 (molibdato de potasio):	PA 0,025 g
$B_4O_7Na_2 \cdot 10H_2O$ (tetraborato de sodio decahidratado):	PA 0,025 g

$Cl_2Cu \cdot 2H_2O$ (cloruro de cobre (II) dihidratado):	PA 0,025 g
$(NO_3)_2Co \cdot 6H_2O$ (nitrato de cobalto (II) hexahidratado):	PA 0,025 g
Cl_2Zn (cloruro de zinc):	PA 0,025 g
VO_3NH_4 (vanadato de amonio):	PA 0,010 g
Agua destilada: hasta 100 ml.	

La solución de oligoelementos puede conservarse durante un mes a una temperatura comprendida entre + 1 y + 4°C.

Completar el volumen (1 litro) y homogeneizar. El medio debe utilizarse dentro de un plazo de 12 horas.

1.6.1.3. Sustancias de referencia

Anilina (recién destilada), acetato de sodio, benzoato de sodio, glucosa.

1.6.2. *Equipo*

Material corriente de laboratorio y:

— aparato para medir el carbono orgánico,

— espectrofotómetro,

— centrífuga (4 000 g),

— agitador que permita una aeración y una agitación suficientes,

— equipo para medir el oxígeno disuelto, pHmetro, matraces cónicos de boca ancha de 500 mililitros estériles,

— equipo para filtración estéril (membrana de 0,22 µm de porosidad).

El material de vidrio debe estar cuidadosamente limpio y totalmente libre de materias orgánicas o tóxicas.

1.6.3. *Preparación del inóculo*

Extraer un volumen suficiente de una mezcla de tres muestras de aguas de superficie contaminadas y de efluentes de salida de estaciones depuradoras urbanas, carentes de contaminación específica importante. El contenido en bacterias de cada muestra debe ser por lo menos de 10^5 bacterias por mililitro.

Las muestras deben utilizarse para la inoculación en un plazo de 12 horas, incluido el transporte, y no deben permanecer más de 6 horas sin aeración.

Filtrar con papel para eliminar las partículas más gruesas, recoger el filtrado y pasarlo por un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 micrómetros.

Lavar con una solución isotónica adecuada. Transferir las bacterias que se han depositado en la membrana a un pequeño volumen de una solución isotónica cualquiera. Mezclar bien. Medir la absorción a 620 nm y deducir la concentración de las bacterias refiriéndose a una curva patrón establecida previamente por recuento en medio sólido, utilizando la cepa *Pseudomonas fluorescens* ATCC 15453. Añadir el volumen de solución necesaria para situar la concentración de bacterias en $(5 \pm 3) \times 10^7$ por mililitro. Utilizar el inóculo en la hora siguiente.

1.6.4. *Ensayo*

La incubación debe realizarse en ausencia de cualquier luz intensa y en un incubador mantenido a una temperatura de 20 a 25°C y libre de vapores tóxicos.

Preparar las soluciones siguientes:

1. Solución de la sustancia de ensayo en el medio de ensayo de forma que se obtenga una concentración en carbono orgánico de 40 miligramos por litro.

2. Solución de glucosa en el medio de ensayo de forma que se obtenga una concentración en carbono orgánico de 40 miligramos por litro.

3. Solución que contenga en el medio de ensayo la sustancia de ensayo y la glucosa en las concentraciones utilizadas.

4. Un volumen suficiente del medio de ensayo.

Mezclar separadamente las cuatro soluciones y esterilizarlas pasándolas por un filtro de membrana.

Los filtros de membrana son idóneos cuando se ha comprobado que no liberan carbono y no absorben la sustancia al filtrar.

Todas las manipulaciones que sean necesarias hay que efectuarlas por métodos estériles. Repartir las soluciones en los matraces de ensayo (previamente esterilizados) de la siguiente forma:

Matraz nº 1 (ensayo):	150 ml de solución 1
Matraz nº 2 (ensayo):	150 ml de solución 1
Matraz nº 3 (ensayo):	150 ml de solución 1
Matraz nº 4 (testigo estéril):	150 ml de solución 1
Matraz nº 5 (testigo glucosa):	150 ml de solución 2
Matraz nº 6 (testigo acción inhibidora):	150 ml de solución 3
Matraz nº 7 (blanco):	150 ml de solución 4

Sembrar los matraces 1, 2, 3, 5, 6 y 7 con 1,5 mililitros de inóculo y mezclar bien agitando manualmente.

Tomar porciones alícuotas de 3 a 5 mililitros de cada frasco.

Centrifugar las alícuotas a 4 000 gramos durante 15 minutos, manteniendo una temperatura inferior a 26° C.

Recoger el sobrenadante para la valoración del carbono orgánico correspondiente al tiempo cero.

Colocar los matraces en el agitador y dejarlos allí mientras dure el ensayo; el tercer día, la concentración en oxígeno disuelto en el matraz nº 5 debe ser por lo menos igual a 5 miligramos por litro.

Procediendo de la misma manera que en las valoraciones del carbono orgánico en el tiempo cero, efectuar las valoraciones en los matraces 1, 2, 3, 5, 6 y 7 después de un período de, al menos, 3, 7, 14 y 28 días de incubación. Sin embargo, si el descenso del contenido en carbono alcanza el 95 % del contenido inicial en los matraces 1, 2 y 3, hay que dar por terminado el experimento.

El ensayo puede terminar antes de los 28 días si se alcanza una meseta en la gráfica antes de esa fecha.

Si se manifiesta una degradación el vigesimoctavo día, pero sin conseguir una meseta, es conveniente prolongar el ensayo 1 o 2 semanas más.

Al final del ensayo, hacer una valoración del carbono orgánico en el matraz nº 4 de la misma manera que en el tiempo cero y probar la esterilidad sembrando en un tubo con medio de cultivo (líquido e incubándolo a 25° C durante 5 días.

Medio de cultivo:

— extracto de levadura deshidratado: 3 g

— peptona pancreática de caseína: 6 g

— agua: 1 000 ml

Disolver los componentes del medio deshidratado en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH de forma que alcance, después de la esterilización, 7,2 ± 0,2 a 20°C.

Si las valoraciones de carbono orgánico deben diferirse, conservar el sobrenadante a 4°C, en la obscuridad, en matraces de cristal tapados herméticamente; el período máximo de conservación

aceptable es de 24 horas. Si no puede efectuarse el análisis en un plazo de 24 horas, congelar a una temperatura inferior a 18°C.

Para compensar las pérdidas de agua debidas a la evaporación, comprobar antes de cada extracción el volumen del medio en el matraz y añadir, si es necesario, agua destilada esterilizada filtrando con la membrana con poros de 0,22 micrómetros, para completar el volumen hasta el valor medido después de la extracción precedente.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los análisis se registrarán según el modelo adjunto (Apéndice 1) y los valores de la biodegradación se calcularán de acuerdo con el punto 1.2.

Los resultados del ensayo de degradación son válidos si se cumplen las siguientes condiciones:

— la tasa de degradación de la glucosa en el matraz nº 5 debe ser al menos del 80 % el séptimo día,

— al final del ensayo, el matraz nº 4 debe seguir estéril,

— la concentración en oxígeno disuelto el tercer día en el matraz nº 5 debe ser al menos de 5 miligramos por litro.

El séptimo día, la tasa de biodegradación de la glucosa en el matraz nº 6 debe ser al menos igual al 75 % del observado en el matraz nº 5. Si no se alcanza este límite, se puede suponer que la sustancia sometida a ensayo tiene un efecto inhibidor sobre las bacterias presentes y que, por lo tanto, el método no le es aplicable en la concentración establecida.

Notas

La comparación de los porcentajes de eliminación del carbono en los matraces 1, 2 y 3, por una parte, y en el matraz nº 4 por la otra, permiten diferenciar las causas de la degradación observada:

— fenómenos fisicoquímicos en el matraz nº 4,

— fenómenos fisicoquímicos y biológicos en los matraces 1, 2 y 3.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir en el informe todos los resultados de los experimentos realizados con la sustancia de ensayo, con la sustancia de referencia y en blanco.

Se deben mencionar, especialmente, los siguientes puntos:

— tasa de desaparición del producto en el matraz nº 4 al término del ensayo,

— fenómenos de inhibición que puedan observarse,

— pruebas de validez del ensayo,

— el desarrollo del ensayo de degradación se representa en un diagrama que indique la fase de estado de latencia, la fase de degradación, la pendiente de la curva y el intervalo de tiempo (el « intervalo de tiempo » significa aquí un período de 10 días que comienza el día en que, por primera vez, la tasa de biodegradabilidad observada sobrepasa el 10 %).

3.2. Interpretación de los resultados

Siendo este ensayo tan riguroso, un resultado bajo no significa, necesariamente, que la sustancia sometida a ensayo no sea biodegradable en condiciones ambientales; indica simplemente que son necesarios estudios complementarios para comprobarlo.

Las sustancias químicas de ensayo que muestren un pérdida importante de COD durante este ensayo, se considerarán fácilmente biodegradables, si dicha pérdida se alcanza en los 10 días siguientes a aquel en que la tasa de biodegradación sobrepase, por primera vez, el 10 %.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, Paris 1981, Test guideline 301A. Decision of the Council C (81) 30, Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, Nº 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, Nº 1, 1981, p. 45-55.

(4) AFNOR: Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called « total » of organic products. T 90-302.

Apéndice 1

Ensayo AFNOR NF T 90/302 modificado (Formulario)

Experimento nº: .....

Fecha de inicio del ensayo: .....

Sustancia de ensayo de referencia: .....

Conclusión teórica del ensayo: .....

Valoración del carbono: .....

Valoración del carbono

Medio de cultivo	Matraz nº	Concentración en COD después de × dias en mg/l				
		t = 0	3	7	14	28 dias
Ensayo	1	1_{C_0}	1_{C_3}	1_{C_7}	$1_{C_{14}}$	$1_{C_{28}}$
Ensayo	2	2_{C_0}	2_{C_3}	2_{C_7}	$2_{C_{14}}$	$2_{C_{28}}$
Ensayo	3	3_{C_0}	3_{C_3}	3_{C_7}	$3_{C_{14}}$	$3_{C_{28}}$
Media	1 — 3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Testigo estéril	4	4_{C_0}				$4_{C_{28}}$
Testigo glucosa	5	5_{C_0}	5_{C_3}	5_{C_7}	$5_{C_{14}}$	$5_{C_{28}}$
Testigo inhibidor	6	6_{C_0}	6_{C_3}	6_{C_7}	$6_{C_{14}}$	$6_{C_{28}}$
Testigo inóculo	7	$C_{bl(0)}$	$C_{bl(3)}$	$C_{bl(7)}$	$C_{bl(14)}$	$C_{bl(28)}$

Cálculo

	t = 0	3	7	24	28 dias
Ensayo $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Testigo glucosa $\left[1 - \frac{5C_t - C_{bl(t)}}{5C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Testigo inhibidor $\left[1 - \frac{6C_t - C_{bl(t)}}{6C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				

Validez:

— oxigeno disuelto, matraz nº 5, tercer día: ..... mg/l,

— porcentaje de biodegradación, matraz nº 5, séptimo día: ..... %,

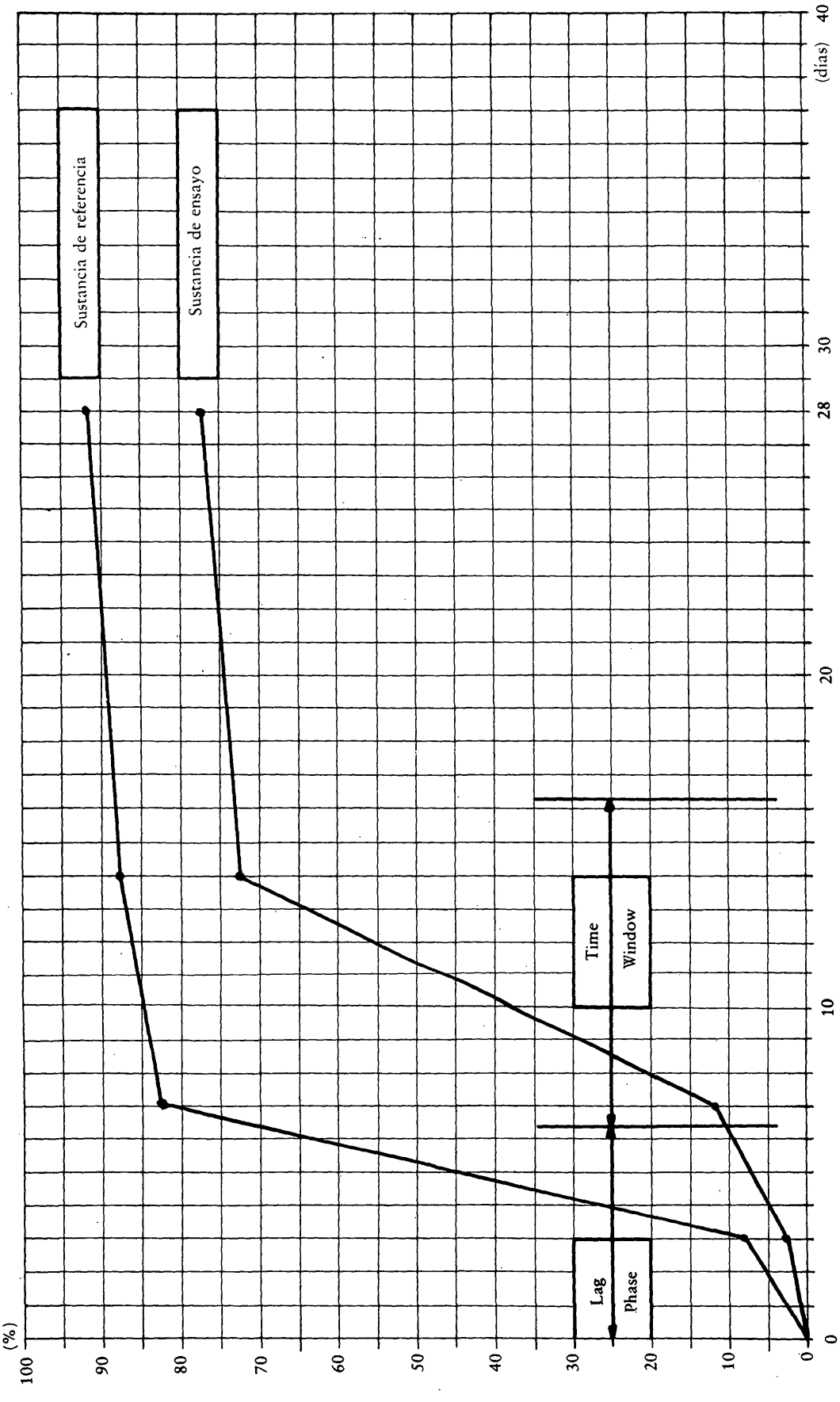
— porcentaje de biodegradación, matraz nº 6, séptimo día: ..... %,

— esterilidad, matraz nº 4: .....

Apéndice 2

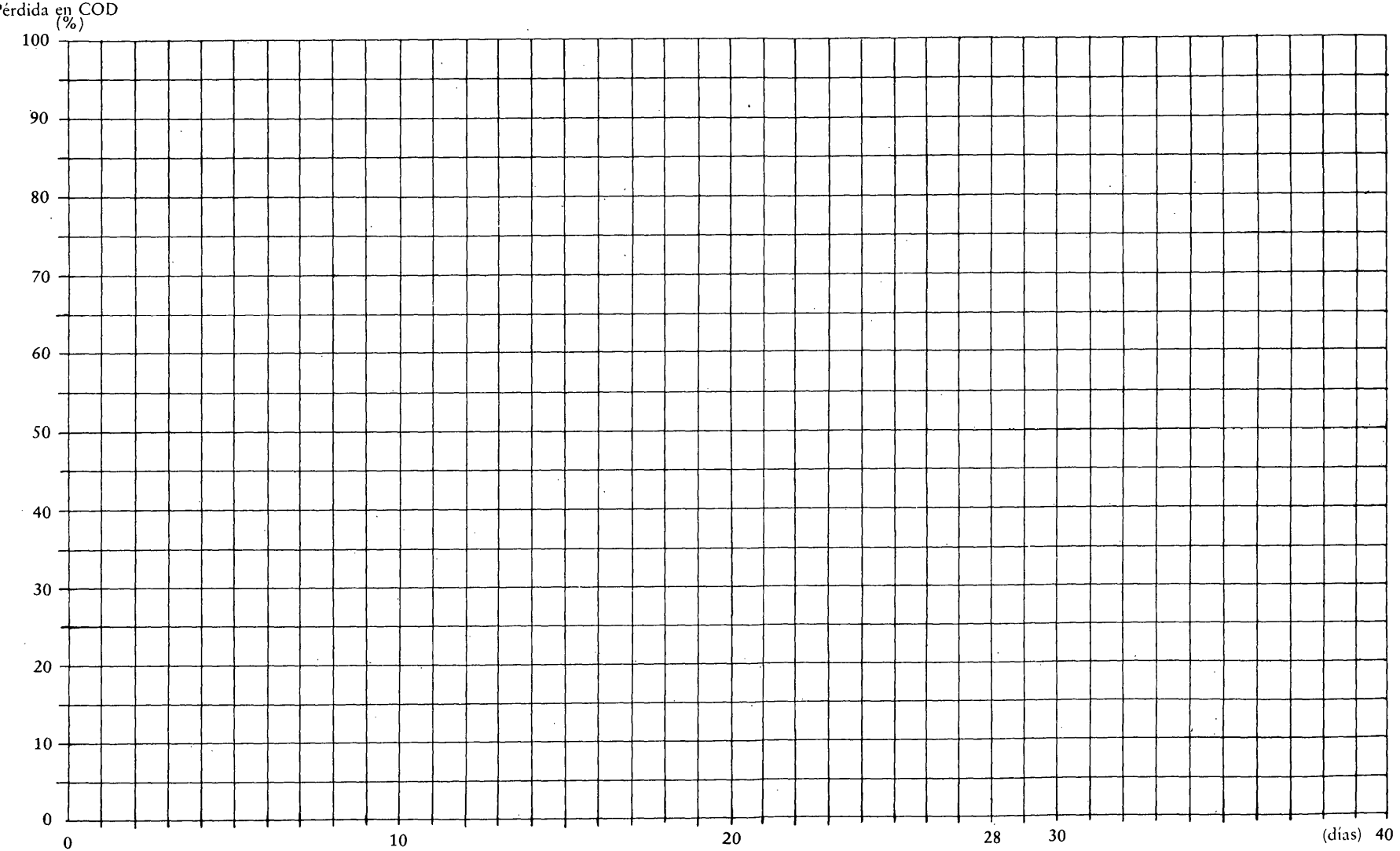
Ensayo AFNOR NF T 90/302 modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



Ensayo AFNOR NF T 90/302 modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo:..... Experimento nº: .....



C.5. DEGRADACIÓN BIÓTICA: ENSAYO STURM MODIFICADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método es medir la biodegradabilidad de sustancias orgánicas no volátiles en un medio acuoso aeróbico, mediante dos concentraciones iniciales de 10 y de 20 miligramos por litro (concentraciones de base).

El contenido en carbono orgánico de la sustancia de ensayo debe ser conocido (análisis del contenido en carbono orgánico total o estimación aplicando la fórmula empírica que permite calcular la demanda teórica de CO_2).

El método sólo es aplicable a las sustancias de ensayo orgánicas que, a la concentración de ensayo:

— tienen una presión de vapor despreciable,

— no ejercen acción inhibidora sobre las bacterias.

Al menos en principio, el método puede aplicarse a las sustancias poco solubles en las concentraciones de ensayo.

Para interpretar los resultados es útil conocer las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de ensayo, especialmente cuando los resultados obtenidos sean bajos o poco significativos.

E conveniente conocer los efectos tóxicos de la sustancia química sobre los microorganismos para poder interpretar los resultados bajos y elegir las concentraciones apropiadas.

1.2. Definiciones y unidades

La degradación se define a partir de la cantidad de CO_2 producida por la sustancia, expresada en porcentaje del valor teórico de CO_2 que hubiera debido producir (« $ThCO_2$ »), valor que se calcula sobre la base del contenido en carbono orgánico de la sustancia de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

Se recomienda utilizar una sustancia de referencia apropiada para verificar la actividad del inóculo.

A tal fin, se puede utilizar, por ejemplo, la anilina, el acetato de sodio o el benzoato de sodio, con los cuales se deberá obtener una producción de $CO_2 \geqslant 60$ %, dentro de los 28 días, para que el resultado sea válido. En caso contrario, deberá repetirse el ensayo con un inóculo procedente de otra fuente.

1.4. Principio del método de ensayo

La sustancia de ensayo se añade a un medio líquido definido sembrado con microorganismos procedentes de aguas residuales aireada a 20-25°C. Se registrará la temperatura durante el período de ensayo.

El CO_2 liberado es captado en forma de CO_3Ba; el seguimiento de la degradación se efectúa mediante el análisis del CO_2, durante un período de 28 días. Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos testigo,

se determina la cantidad total de CO_2 producida por la sustancia de ensayo durante el período de ensayo y se expresa en procentaje en relación al CO_2 total que la sustancia examinada habría teóricamente, debido producir una función de su contenido en carbono.

El proceso se verifica por medio de un inóculo testigo (ver punto 1.6.1.3).

1.5. **Criterios cualitativos**

La reproducibilidad del método se ha establecido a partir del ensayo de intercalibración de la CEE y de la OCDE.

La producción endógena de CO_2 del inóculo, medida en el matraz testigo, constituye la razón principal por la cual la sustancia de ensayo que se ha de utilizar no debe tener una concentración inferior a 5 miligramos por litro.

Cuando el ensayo se adapta para la utilización de sustancias de referencia marcadas en el ^{14}C, la concentración puede ser netamente inferior.

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. Agua de alta calidad

Agua bidestilada, sin sustancias tóxicas (en particular, cobre), con un contenido bajo en carbono (< 2,0 mg/l COT) y una resistividad de ≥ 18 megaohms por centímetro. El agua destilada no debe contener más del 10 % del carbono orgánico aportado por la sustancia de ensayo.

1.6.1.2. Solución nutritiva

a) Solución madre

$Cl_3Fe{\cdot}6H_2O$ (cloruro de hierro (III) hexahidratado) disolver en 1 000 ml de agua (1.6.1.1)	0,25 g
SO_4Mg7H_2O (sulfato de magnesio heptahidratado) disolver en 1 000 ml de agua (1.6.1.1)	22,50 g
Cl_2Ca (cloruro de calcio) disolver en 1 000 ml de agua (1.6.1.1)	27,50 g
PO_4KH_2 (fosfato monopotásico)	8,50 g
PO_4K_2H (fosfato dipotásico)	21,75 g
$PO_4Na_2H{\cdot}2H_2O$ (fosfato disódico dihidratado)	33,40 g
Cl_4NH_4 (cloruro de amonio) disolver en 1 000 ml de agua (1.6.1.1)	1,70 g
$SO_4(NH_4)_2$ (sulfato de amonio) disolver en 1 000 ml de agua (1.6.1.1)	40,00 g

b) Medio de ensayo

El medio de ensayo contendrá, por litro, las siguientes cantidades de solución:

— 4 ml de solución de cloruro férrico,

— 1 ml de solución de sulfato de magnesio,

— 1 ml de solución de cloruro de calcio,

— 2 ml de solución de fosfato,

— 1 ml de solución de sulfato de amonio.

El valor del pH deberá ser de 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Sustancias de referencia

Anilina (recién destilada), acetato de sodio, benzoato de sodio.

1.6.1.4. Hidróxido de bario 0,025 N (0,0125 M)

Disolver 4 gramos de $Ba(OH)_2.8H_2O$ por litro de agua de alta calidad. Filtrar con un filtro de papel y tapar la solución límpida para evitar la absorción del CO_2 contenido en el aire. Se aconseja preparar más de 5 litros de solución de una sola vez para poder realizar toda la serie de ensayos.

1.6.2. *Equipo*

1.6.2.1. Equipo de captación del CO_2

El equipo indicado está previsto para una serie de 12 frascos (3 sustancias de ensayo); aquí, se entiende por frasco un recipiente de cristal de color topacio con una capacidad de 4 a 5 litros. Si se utilizan recipientes de cristal sin colorear, el ensayo deberá efectuarse en la obscuridad.

Cuatro recipientes de plástico, de 1 litro de capacidad, que contengan 700 mililitros de NaOH 10 N (10 M).

Un matraz Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contengan 700 mililitros de solución de $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M).

Un matraz Erlenmeyer de 1 litro para recoger el posible exceso de líquido. Estos recipientes se conectan en serie, mediante un tubo inerte, a una fuente de aire comprimido; el aire debe pasar a través de las soluciones captadoras a una velocidad constante. Por cada serie de 4 frascos suplementarios, añadir un recipiente de plástico de 1 litro de capacidad, lleno de 700 milímetros de NaOH 10 N (10 M).

1.6.2.2. Equipo de producción de CO_2

Cuatro frascos de cristal de color topacio, de 4 a 5 litros de capacidad, para cada sustancia de ensayo.

Tapones y tubos flexibles de plástico.

1.6.2.3. Botellas captadoras de CO_2

Botellas captadoras de 100 mililitros conteniendo el hidróxido de bario.

1.6.3. *Preparación del inóculo*

Los organismos que hay que utilizar para los ensayos deben proceder de lodos activados recién extraídos de una estación de depuración municipal que funcione normalmente. Dicha estación no debe tratar, o sólo en poca cantidad, efluentes industriales.

Al llegar al laboratorio, se airea el lodo activado durante 4 horas. Se extraen 500 mililitros de la mezcla y se homogeneizan mecánicamente durante 2 minutos. A continuación se decanta la mezcla durante 30 minutos.

Si al cabo de 30 minutos el líquido sobrenadante aún contiene una cantidad importante de partículas sólidas, se puede continuar la decantación durante 30 o 60 minutos más, o adaptar el lodo a las condiciones de laboratorio para obtener una decantación mejor.

Decantar el líquido sobrenadante de forma que se obtenga un volumen suficiente para permitir una siembra del 1 % en cada uno de los frascos donde se medirá el desprendimiento de CO_2. Evitar el arrastre excesivo de partículas sólidas de lodo, si no, se corre el riesgo de falsear la medición de la producción de CO_2.

Aunque no sea imprescindible, es conveniente proceder a un recuento para determinar el número de microorganismos presentes en el sobrenadante. El inóculo debe contener normalmente de 10^6 a 20×10^6 unidades por mililitro.

Debe utilizarse el mismo día de su preparación.

1.6.4. *Procedimiento*

1.6.4.1. Solución madre

Preparar una solución madre inicial de la sustancia de ensayo, disolviéndola en agua de alta calidad hasta que se obtenga una concentración de 1 000 miligramos por litro.

Las soluciones madre se preparan en función del contenido en carbono orgánico de la sustancia de ensayo. Si dicho contenido se desconoce, llevar las soluciones madre a la concentración requerida basándose en el peso de las sustancias. Para obtener una muestra homogénea, hay que mezclar bien, evitando la formación de espuma.

En el caso de muestras sólidas, puede ser necesario disolver y mezclar el contenido de los recipientes antes de extraer una parte alícuota. Esta parte del procedimiento es sumamente importante, ya que la precisión en el cálculo de la tasa de biodegradabilidad depende de una cuantificación correcta del carbono orgánico introducido en el sistema de ensayo.

El pH de la solución madre no necesita ajustarse si está situado siempre entre 3 y 10; su valor se determina por el tampón fosfato presente en la composición del medio de ensayo. Si el pH se situa fuera de los límites indicados, hay que ajustar una parte alícuota de la solución madre a un pH 7,0 (± 1,0) mediante ClH o NaOH 1 N (1 M), asegurándose de que la solución se homogeniza perfectamente durante la adición del ácido o la base.

Para confirmar la concentración nominal en carbono orgánico de la sustancia de ensayo, la solución madre (o una parte alícuota neutralizada) puede someterse a un análisis del carbono orgánico total.

Este análisis se impone para la solución madre de la sustancia de referencia.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en agua, introducir la cantidad necesaria de dicha sustancia, en peso o en volumen, directamente en el frasco.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en las concentraciones de ensayo, se habrán de tomar medidas específicas, por ejemplo, utilizar un procedimiento de dispersión por ultrasonidos, a fin de obtener una buena dispersión de la sustancia de ensayo.

1.6.4.2. Condiciones del ensayo

Dado que el inóculo debe utilizarse al 1 %, se deben efectuar disoluciones en el medio de ensayo.

La forma de proceder más sencilla es la siguiente:

a) añadir 2 470 mililitros de agua de alta calidad (ver punto 1.6.1.1) en cada uno de los frascos de 4-5 litros;

b) añadir en cada frasco de 4-5 litros, respectivamente, 3 mililitros de soluciones madre de sulfato de amonio, de sulfato de magnesio y de cloruro de calcio, así como 6 mililitros de solución tampón fosfato y 12 mililitros de solución de cloruro férrico;

c) añadir 30 mililitros de inóculo procedente de los lodos activados en cada uno de los frascos de 4-5 litros.

Eliminar el dióxido de carbono de la mezcla por burbujeo durante 24 horas, con aire libre de CO_2.

Después del período de aireación, llenar tres botellas captadoras con 100 mililitros de $Ba(OH)_2$ de 0,025 N (0,0125 M) y conectarlas en serie a la salida de cada frasco.

1.6.4.3. Realización del ensayo

El proceso se inicia introduciendo la sustancia de ensayo en 2 de los 4 frascos. Cada sustancia se somete a ensayo en dos concentraciones: 10 y 20 miligramos por litro. La cantidad de solución madre necesaria par cada frasco, se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\text{cantidad de solución madre por frasco, en ml} = \frac{B \times C}{A}$$

donde,

B = concentración de la sustancia de ensayo en el frasco (mg/l)

A = concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre (mg/l)

C = volumen final del medio de ensayo en el frasco (mg/l).

Añadir en los frascos pertinentes la cantidad suficiente de solución madre para obtener la concentración de ensayo, según la fórmula anterior, y completar con agua destilada hasta obtener 473 mililitros (solución madre + agua de alta calidad). Añadir en el tercer frasco, que se utiliza como testigo y que no contiene sustancia de ensayo, 473 mililitros de agua de alta calidad.

El volumen final de cada frasco es, ahora, de 3 000 mililitros.

Añadir al último de los 4 frascos una sustancia de referencia en una concentración de 20 miligramos por litro.

El ensayo, propiamente dicho, comienza inyectando aire libre de CO_2 en la solución, a una velocidad de flujo de 50 a 100 mililitros por minuto y por frasco (alrededor de una a dos burbujas por segundo).

En el caso de las sustancias de ensayo no solubles en el agua, introducidas en seco en el frasco, mejorar la homogeneización por medio de un agitador magnético. Respecto a los agentes espumantes, el burbujeo con aire libre de CO_2 puede reemplazarse por una aeración en superficie de la solución y una agitación con un dispositivo magnético.

El CO_2 producido en cada frasco reacciona con el hidróxido de bario y se precipita en forma de carbonato de bario; la cantidad de CO_2 producida se evalúa valorando el $Ba(OH)_2$ residual con ClH valorado a 0,05 N (0,05 M). Retirar periódicamente (cada 2 o 3 días) la botella captadora de CO_2 más próximo al frasco para efectuar la valoración. Aproximar las dos botellas captadoras restantes e introducir al final de la serie una nueva botella captadora llena de 100 mililitros de $Ba(OH)_2$, reciente, a 0,025 N (0,0125 M).

En caso necesario efectuar las valoraciones (antes de la aparición de precipitados de CO_3Ba en la segunda botella captadora), aproximadamente cada dos días, durante los diez primeros días, y después, cada cinco días hasta el vigesimoctavo día.

El vigesimoséptimo día, medir de nuevo el pH de las soluciones de los frascos y añadirles, a continuación, 1 mililitro de ClH concentrado por frasco para descomponer los carbonatos. Airear los frascos durante la noche y extraer muestras de cada uno de ellos para determinar el carbono orgánico disuelto. Efectuar la valoración final el vigésimo octavo día.

Después de haber retirado las botellas captadoras más próximas a los frascos, valorar 100 mililitros de solución de $Ba(OH)_2$ con ClH a 0,05 N (0,05 M) utilizando la fenolftaleína como indicador.

Efectuar el ensayo a temperatura ambiente (20 a 25°C) y registrar la temperatura durante todo su desarrollo.

Si aparece una meseta en la gráfica de biodegradación antes del vigésimoctavo día, el ensayo puede darse por concluido.

Si la degradación ha comenzado perceptiblemente el vigésimoctavo día, pero sin llegar a alcanzar una meseta, es conveniente prolongar el ensayo durante una o dos semanas más.

1.6.5. *Determinación del CO_2*

Se podrían considerar otros procedimientos para medir el desprendimiento de CO_2 además de la valoración por retroceso del $Ba(OH)_2$ en las botellas captadoras. Esto no afecta nada el principio de este ensayo y podría incluso permitir una lectura continua de la tasa de biodegradación a medida que evoluciona.

En el primer estadio del cálculo de la cantidad de CO_2 producida debe intervenir un factor de corrección para tener en cuenta la producción endógena de CO_2 en los frascos con sustancia de ensayo. El frasco testigo sirve de « siembra en blanco » lo cual permite una corrección en base al CO_2 que puede producir la respiración endógena de las bacterias. La cantidad de CO_2 producida por la sustancia de ensayo se determina por la diferencia (en ml de reactivo de valoración) entre la botella captadora correspondientes a las series experimentales y las del ensayo en blanco.

En caso de utilizar ClH al 0,05 N (0,005 M) para la valoración en la botella captadora, cada mililitro de ClH valorado corresponderá a 1,1 miligramos de CO_2 producido.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los análisis se registrarán en el formulario adjunto (ver Apéndice 1) y los valores de la biodegradación se calcularán según las indicaciones del punto 1.2.

Las concentraciones de CO_2 se calcularán redondeando a 0,1 miligramos por litro. Los valores de biodegradabilidad se redondearán a la unidad más próxima.

El desarrollo del ensayo de degradaciones se representará gráficamente por un diagrama tal como el que se adjunta como ejemplo (ver Apéndice 2).

Los resultados del ensayo de degradación son válidos si se cumplen las siguientes condiciones:

— que, en una misma serie, la biodegradación de la sustancia testigo sea $\geqslant$ 60 % en 28 días (si no, debe rechazarse la serie entera, y comenzar un nuevo ensayo con inóculo procedente de otra fuente),

— que durante el ensayo, no se haya producido una cantidad significativa de CO_2 en los frascos del ensayo en blanco (contaminación del medio, del vidrio y del aire). Al terminar el ensayo, la producción total de CO_2 no debe superar los 50 miligramos de CO_2 por 3 litros de medio.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— los resultados, reportados según el formulario adjunto (ver Apéndice 1),

— el desarrollo del ensayo de degradación representado en un diagrama que indique la fase de estado latente, la fase de degradación, la pendiente de la curva y el intervalo de tiempo (el « intervalo de tiempo » significa aquí un período de 10 días que se inicia el día en el que el nivel de biodegradación observado sobrepasa, por primera vez, el 10 %),

— el proceso de dispersión de las sustancias no solubles en las condiciones de ensayo,

— la fecha y el lugar de la extracción de los organismos utilizados para el ensayo y el tratamiento sufrido por los organismos antes de la inoculación,

— intervalo de temperaturas registradas durante el período de ensayo,

— en caso de efectuar el recuento indicado en el punto 1.6.2 (inoculación), el número de microorganismos que formen colonias por mililitro,

— las pruebas de validez del ensayo ($\geqslant$ 60 % de degradación en 28 días en las sustancias de referencia).

3.2. Interpretación de los resultados

Siendo este ensayo tan riguroso, un resultado bajo no significa, necesariamente, que la sustancia sometida a ensayo no sea biodegradable en condiciones ambientales; indica simplemente que son necesarios estudios complementarios para comprobarlo.

Se considerarán fácilmente biodegradables las sustancias químicas de ensayo con una tasa de biodegradación elevada, a condición de que dicha tasa se alcance dentro de los 10 días siguientes a aquél en que, por primera vez, la tasa de biodegradación observada sobrepase el 10 %.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, Paris 1981, Test Guideline 301B. Decision of the Council, C (81) 30, Final.

(2) Gerike, P., Fisher, W. K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, Nº 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fisher, W. K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, Nº 1, 1981, p.45-55.

(4) Larson, R. J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, 1979, p. 1153-1161.

Apéndice 1

Ensayo Sturm modificado (Formulario)

Experimento nº: .....

Fecha de inicio del ensayo: .....

Sustancia de ensayo de referencia: .....

Concentración teórica: .....

Análisis del carbono: .....

$ThCO_2$ teórico: .....

Intervalo de temperaturas registradas durante el ensayo: .....

Producción de CO_2:

Días	CO_2 captado em mg	Cantidad acumulativa de CO_2	% de CO_2Th
28			

Validez: .....

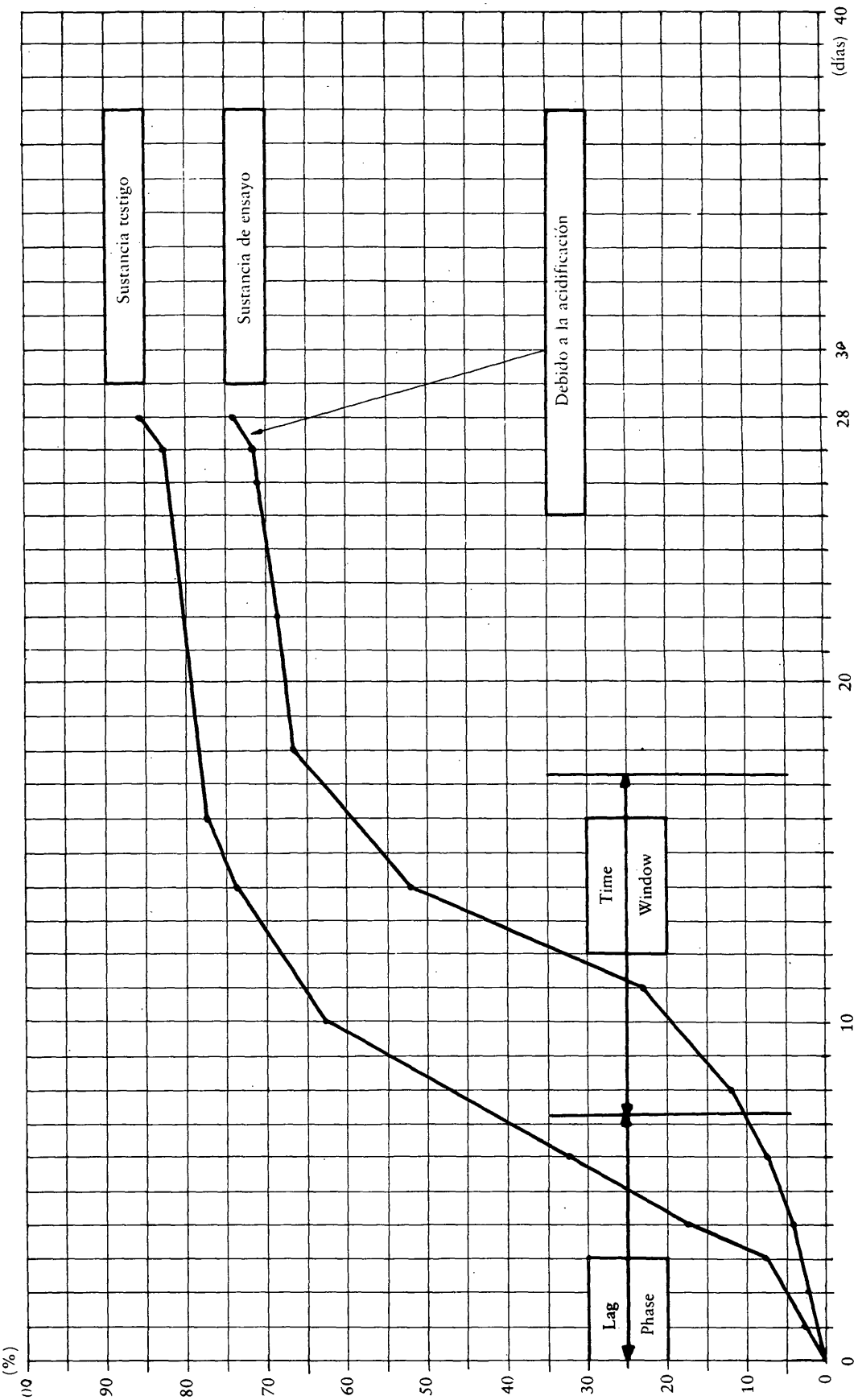
— substancia de referencia y % de biodegradación: .....

— evolución total del CO_2 en los frascos del ensayo en blanco: .....

Apéndice 2

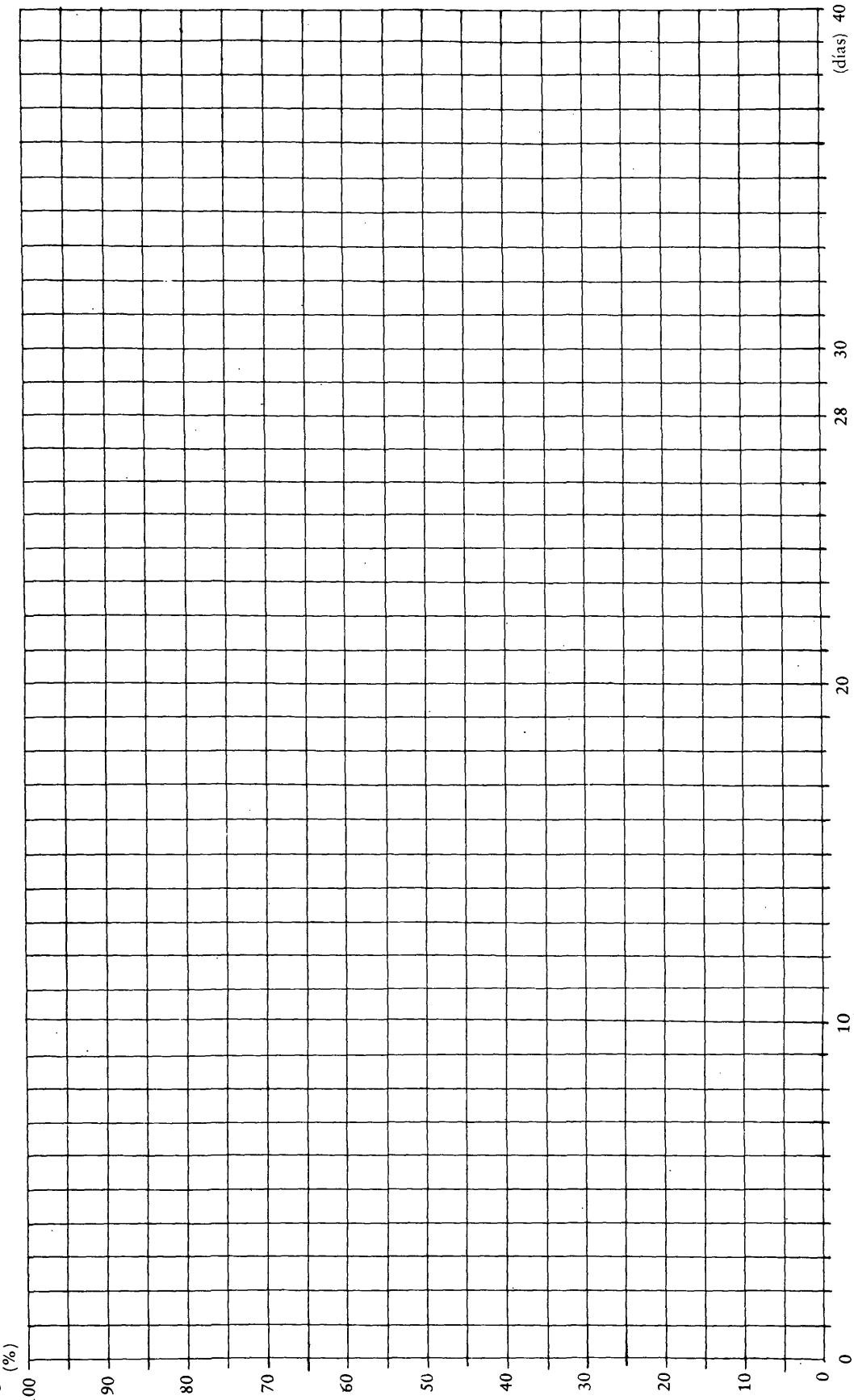
Ensayo Sturm modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



Ensayo Sturm modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



C. 6. DEGRADACIÓN BIÓTICA: ENSAYO EN FRASCO CERRADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo de este método es medir la biodegradabilidad de las sustancias orgánicas en medio acuoso, aeróbico, en una concentración de 2 miligramos por litro (concentración estándar) a 10 miligramos por litro.

Actualmente, el ensayo es especialmente idóneo para evaluar la biodegradabilidad de los compuestos solubles en el agua. No obstante, su aplicación en principio, puede hacerse extensible a los compuestos volátiles o poco solubles en el agua.

La fórmula empírica aplicada a la sustancia de ensayo debe permitir calcular la demanda teórica de oxígeno (DThO); si no se conoce este valor, se podrá utilizar como valor de referencia la demanda química de oxígeno (DQO) de la sustancia de ensayo (ver Apéndice 1).

El método sólo es aplicable a las sustancias de ensayo orgánicas que, a la concentración de ensayo, no inhiban las bacterias. Si la sustancia de ensayo no es soluble en la concentración de ensayo, se puede recurrir a procedimientos especiales, tales como la dispersión por ultrasonido, para lograr una dispersión satisfactoria de la sustancia de ensayo.

Para facilitar la interpretación de los resultados es conveniente disponer de las respectivas proporciones de los principales componentes de la sustancia de ensayo, especialmente cuando los resultados obtenidos sean bajos.

Es conveniente conocer los efectos tóxicos de las sustancias químicas sobre las bacterias para poder interpretar los resultados bajos y para elegir las concentraciones de ensayo adecuadas.

Este método puede utilizarse para determinar la DBO.

1.2. Definiciones y unidades

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) representa la diferencia de consumo de oxígeno entre un testigo en blanco y una solución de la sustancia de ensayo en las condiciones de ensayo. Dividiendo dicha diferencia por la concentración (P/V) de la sustancia de ensayo, se obtiene el consumo de oxígeno que se expresa en mg de DBO por mg de sustancia.

La degradación se define como la relación entre la demanda bioquímica de oxígeno y la demanda teórica de oxígeno (DThO), o la demanda química de oxígeno (DQO), expresadas en porcentaje.

Nota

A veces, los dos modos de calcular (porcentaje de la DThO o porcentaje de la DQO) conducen a resultados diferentes.

$$\% \text{ de biodegradación (DThO)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg sustancia de ensayo}}{\text{DThO}} \times 100$$

o

$$\% \text{ de biodegradación (DQO)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg sustancia de ensayo}}{\text{mg DQO/mg sustancia de ensayo}} \times 100$$

DThO = demanda teórica de oxígeno (cálculo, ver Apéndice)

DQO = demanda química de oxígeno, determinada experimentalmente

1.3. **Sustancias de referencia**

Es conveniente usar productos químicos de referencia adecuados para evaluar la actividad del inóculo.

Podrán utilizarse, a tal fin, la anilina, el acetato de sodio o el benzoato de sodio, con los que se deberá obtener una degradación $\geq$ 60 % dentro de un plazo de 28 días, para que el resultado del ensayo sea válido; en caso contrario, se efectuará un nuevo ensayo con un inóculo procedente de otra fuente.

1.4. **Principio del método de ensayo**

Disolver en un medio mineral (solución de nutrientes minerales), una cantidad determinada de la sustancia de ensayo hasta que se obtenga una concentración de 2 miligramos por litro. Sembrar la solución con un número pequeño de microorganismos de un cultivo mixto y mantener en frascos cerrados a temperatura constante (20 a 21°C) resguardados de la luz.

El proceso de degradación se sigue por análisis del oxígeno durante 28 días. El procedimiento se controla con una sustancia de referencia. Se efectuará un ensayo paralelo sin sustancia de ensayo ni de referencia para determinar el consumo de oxígeno en blanco.

Simultáneamente se controlará la sustancia de ensayo para verificar los posibles efectos de inhibición sobre el inóculo.

1.5. **Criterios cualitativos**

La reproducibilidad del método se ha establecido a partir del ensayo de intercalibración de la CEE y la OCDE.

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. Agua destilada o desionizada

Agua destilada o desionizada que no contenga más de 0,01 mg Cu/l, saturada de aire. El volumen necesario para las operaciones diarias (50 litros, por ejemplo) se mantiene a la temperatura ambiente, cercana a los 20°C, y se airea vigorosamente durante 20 minutos con aire comprimido. Generalmente, el agua está preparada para su uso después de haber permanecido 20 horas a 20°C. Se determina el contenido en oxígeno para los controles. La concentración debe ser de 9,09 mg O_2/l a 20°C. Todas las operaciones de trasvase o de llenado del agua saturada deberán efectuarse por medio de un sifón, sin que se desprendan burbujas.

1.6.1.2. Solución nutritiva

a) Soluciones madre

PO_4KH_2 (fosfato monopotásico):	8,50 g
PO_4KH_2 (fosfato dipotásico):	21,75 g
$PO_4Na_2H \cdot 2H_2O$ (fosfato disódico dihidratado):	33,30 g
$ClNH_4$ (cloruro de amonio):	1,70 g
disolver en 1 000 ml de agua destilada.	
El pH debe ser 7,2.	
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado):	22,50 g
disolver en 1 000 ml de agua destilada.	
Cl_2Ca (cloruro de calcio):	27,50 g
disolver en 1 000 ml de agua destilada.	
$Cl_3Fe \cdot 6H_2O$ (cloruro de hierro (III) hexahidratado):	0,25 g
disolver en 1 000 ml de agua destilada.	

b) Medio de ensayo

El medio de ensayo contendrá, por litro de agua (1.6.1.1), 1 mililitro de cada una de las soluciones madre citadas.

El pH será igual a 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Sustancias de referencia

Anilina (recién destilada), acetato de sodio, benzoato de sodio.

1.6.2. *Equipo*

1.6.2.1. Se pueden utilizar frascos aforados con tapón de vidrio, de 250 a 300 mililitros, o frascos no aforados de cuello estrecho, y tapón de cristal, de 250 mililitros, con volúmenes a determinar.

1.6.2.2. Diversos frascos de 2, 3 y 5 litros graduados para la preparación del experimento y para el llenado de los frascos de DBO.

1.6.2.3. Pipetas de una capacidad de 1 a 10 mililitros. Ampollas de decantación y papel filtro grueso. Frascos para la preparación del inóculo.

1.6.2.4. Baño-maría para mantener los frascos a temperatura constante, resguardados de la luz.

1.6.3. *Preparación del inóculo*

Para la siembra puede utilizarse uno de los procedimientos siguientes; su validez puede controlarse con una sustancia de referencia (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inóculo a base de suelos

Se ponen en suspensión 100 g de tierra de jardín, a la cual no se le haya añadido recientemente abonos (se recomienda especialmente usar tierra procedente de un invernadero mantenido a una temperatura constante durante todo el año), en un litro de agua potable sin cloro. Después de 30 minutos, se filtra la suspensión con un papel filtro grueso, descartándose los dos primeros mililitros del filtrado. El resto del filtrado sirve de inóculo (1 gota por litro de volumen final). El inóculo debe prepararse justo antes del ensayo. Si se ha de conservar durante varias horas, deberá airearse. El número de gérmenes puede determinarse contando sobre gelosa nutritiva o plaquetas nutritivas. No deberían existir más de 10^3 a 10^5 gérmenes por mililitro de volumen final.

1.6.3.2. Inóculo procedente de un efluente secundario

Es preferible preparar el inóculo utilizando un efluente secundario (instalación de lodos activados o lechos bacterianos que traten especialmente aguas domésticas). El efluente debe ser aireado desde su extracción hasta que se utilice. Para la preparación del inóculo, se filtra la muestra a través de un papel filtro grueso, y se descartan los primeros 200 mililitros. El resto se airea convenientemente hasta el momento de su utilización. El inóculo debe utilizarse el mismo día de su recogida.

1.6.3.3. Inóculo procedente de lodos activados de laboratorio

Se utiliza el efluente procedente de una instalación experimental de lodos activados, equipada con un dispositivo de aeración potente. La solución de inoculación se prepara tal como se indica en el punto 1.6.3.2.

1.6.3.4. Inóculo mixto

Se prepara mezclando convenientemente volúmenes iguales de los tres tipos de inóculos anteriormente descritos (1.6.3.1 a 1.6.3.3).

1.6.4. *Procedimiento*

Todas las manipulaciones que se realicen antes de la incubación deben efectuarse a una temperatura próxima a los 20°C.

Se preparan diferentes lotes de frascos (1.6.2.1) para la determinación de la DBO de las sustancias de ensayo y de las sustancias de referencia, en series de experimentación simultáneas (ver Apéndice 2). Si los análisis químicos se efectúan simultáneamente hay que prever un número suficiente de frascos, incluidos los frascos necesarios para los controles con inóculo y en blanco. Se prepararán, por ejemplo, 7 o 15 frascos por cada sustancia sometida a ensayos de 0,5, 15 y 28 días, después de haber preparado un volumen de agua suficiente en grandes frascos (1.6.2.2).

Estos frascos grandes se llenan primero de agua destilada hasta un tercio de su volumen mediante un sifón de tubo flexible (1.6.1.1). A continuación, se introducen cada una de las soluciones madre (1.6.1.2) en los frascos hasta obtener el volumen final y se añaden las sustancias de ensayo o de referencia hasta alcanzar las concentraciones definitivas de 2 miligramos por litro, y, algunas veces, de 5 a 10 miligramos por litro.

La concentración aproximada de 9 miligramos de oxígeno disuelto por litro de agua de disolución a 20°C limita la concentración inicial posible de la sustancia de ensayo a unos 2 miligramos por litro, a fin de asegurar el mantenimiento de una concentración en oxígeno elevada después de la oxidación de la sustancia.

Las sustancias poco degradables o las sustancias con una DThO baja pueden experimentarse paralelamente a concentraciones más elevadas.

La siembra se realiza con la pipeta a razón de una gota por litro de volumen final; para el ensayo en blanco se procede de la misma manera.

Por último, se completará el volumen de solución requerido mediante sifón con un tubo flexible que toque el fondo del frasco; con ello se obtendrá una mezcla suficiente de solución. A continuación, se verterá inmediatamente cada solución en su lote respectivo de frascos mediante sifón, pero con el tubo flexible sumergido sólo hasta las tres cuartas partes del frasco (no hasta el fondo).

Además, los frascos destinados al examen en tiempo O se analizarán o se someterán a un tratamiento para asegurar su conservación con vistas a análisis posteriores (para la determinación del O_2, precipitación con Cl_2Mn y NaOH).

Los demás frascos preparados paralelamente se colocan en un baño maría a 20°C, resguardados de la luz; se retirarán del baño y se analizarán después de 5, 15 y 28 días.

Cada serie va acompañada de una serie completa de ensayos paralelos para la determinación en blanco, el consumo de oxígeno sin inoculación y la sustancia de referencia.

Ensayo de inhibición:

Es fácil y simple controlar los efectos de inhibición de las sustancias en un ensayo en frasco cerrado:

Serie 1: 2 mg/l de un compuesto fácilmente biodegradable, por ejemplo, un alcohol graso condensado con óxido de etileno con una relación molecular de 1:10, o cualquier otra sustancia química de control.

Serie 2: x mg/l de la sustancia de ensayo (normalmente x es igual a 2).

Serie 3: 2 mg/l de compuestos fácilmente biodegradables, más x mg/l de la sustancia de ensayo.

Si los valores DBO de la serie 3 son inferiores a la suma de los valores de las series 1 y 2 se puede considerar que la sustancia de ensayo no tiene efectos inhibidores sobre las bacterias con esta concentración. Este control es siempre necesario, si teniendo en cuenta la estructura de la sustancia de ensayo, una degradación negativa o baja, para ilógica, es decir, si hay indicios de que está provocada por fenómenos de inhibición.

1.6.5. *Determinación del oxígeno disuelto*

La valoración del oxígeno disuelto se efectúa por métodos químicos o electrónicos normalizados, nacionales o internacionales, ampliamente reconocidos.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del análisis se registrarán en el formulario adjunto (ver Apéndice 3).

La evolución de la degradación se representará gráficamente en un diagrama.

Los resultados del ensayo de degradación serán válidos si se cumplen las siguientes condiciones:

— que en la misma serie de ensayos, la sustancia de referencia muestre una biodegradación $\geqslant$ 60 % para un período de 28 días, si no, debe desecharse toda la serie;

— que el consumo de oxígeno, sin inoculación, no exceda de 0,3 miligramos de oxígeno por litro después de 5 días y 0,4 miligramos de oxígeno por litro después de 28 días; el testigo con inoculación no deberá mostrar un consumo mayor de 0,5 miligramos de oxígeno por litro después de 5 días y de 0,6 miligramos de oxígeno por litro después de 15 a 28 días.

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— los resultados, registrados según el formulario adjunto (ver Apéndice 3),

— el desarrollo del ensayo de degradación representado en un diagrama que indique la fase de estado latente, la fase de degradación, la pendiente de la curva, el intervalo de tiempo (el «intervalo de tiempo» significa aquí un período de 10 días que se inicia el día en el que el nivel de biodegradación observado sobrepasa, por primera vez, el 10 %),

— el método utilizado para la determinación del DQO,

— el método utilizado para medir el oxígeno,

— la justificación y los comentarios científicos relativos a cualquier modificación del procedimiento o a la eliminación del ensayo,

— el procedimiento de dispersión para las sustancias poco solubles en las condiciones de ensayo,

— las pruebas de validez del ensayo.

3.2. Interpretación de los resultados

Se tendrá en cuenta la posible influencia de los compuestos nitrogenados sobre los resultados.

Siendo este ensayo tan riguroso, un resultado bajo no significa, necesariamente, que la sustancia sometida a ensayo no sea biodegradable en condiciones ambientales; indica, simplemente, que es preciso realizar estudios complementarios para comprobarlo.

Las sustancias químicas que, en este ensayo, muestren un consumo elevado de oxígeno se considerarán fácilmente degradables, a condición de que dicho nivel de consumo alcance dentre de los 10 días siguientes a aquel en que, por primera vez, el nivel de biodegradación observado sobrepase el 10 %.

4. BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, París 1981, Test Guideline 301D, Decision of the Council C (81) 30, Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology an Environmental Safety, Vol. 3, Nº 2, 1979, p. 159-173.

(3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, Nº 1, 1981, p. 45-55.

Apéndice 1

Cálculo de la demanda bioquímica teórica de oxígeno

La DThO del compuesto $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de peso molecular PM se calcula aplicando la siguiente relación:

$$DThO_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Esta relación implica que C se mineraliza en CO_2, H en H_2O, P en P_2O_5 y Na en Na_2O. El halógeno se elimina en forma de halogenuro de hidrógeno y el nitrógeno en forma de amoniaco.

Ejemplo:

glucosa $C_6H_{12}O_6$, PM 180

$$DThO = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucosa}$$

Para el cálculo de los pesos moleculares de las sales distintas a los de los metales alcalinos, se supone que dichas sales han sido hidrolizadas.

El azufre se supone oxidado al estado de +6.

Ejemplo:

n-alkilbencenosulfonato de sodio $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$DThO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg de sustancia}$$

En el caso de los compuestos que contengan nitrógeno, éste puede eliminarse en forma de amoniaco, de nitrito o de nitrato, según las diferentes demandas bioquímicas teóricas de oxígeno.

$$DThO_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

$$DThO_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

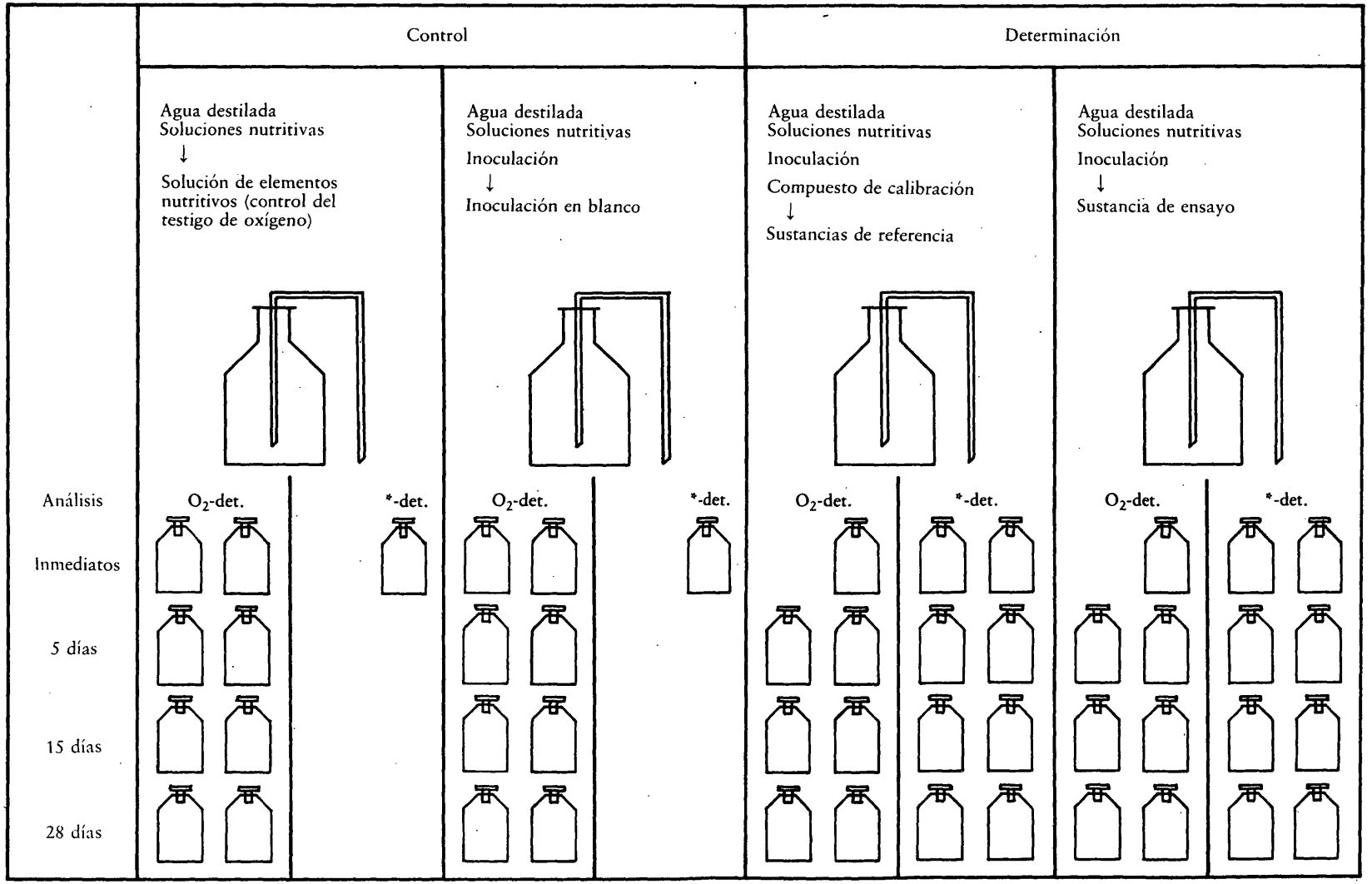
Suponiendo que una formación total de nitrato haya sido observada por análisis, por ejemplo, en el caso de una amina secundaria: $(c_{12}H_{25})_2NH$, PM = 353

$$DThO_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg de sustancia}$$

Apéndice 2

Esquema del reparto de frascos para el ensayo en frasco cerrado

(* = para un control de análisis específico)



Apéndice 3

Degradación biótica: ensayo en frasco cerrado (formulario)

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: .....

Responsable del ensayo: .....

Fecha de inicio del ensayo: ..... Experimento nº: .....

Sustancia de ensayo: .....

Composición química: .....

Análisis (metodo Winkler o el electrodo de oxígeno): .....

DThO o DQO de la sustancia de ensayo: ..... mg O_2/mg

Temperatura del agua de disolución después de aeración: .....

Concentración en oxígeno del agua después de aeración, y al comienzo del ensayo: .....

..... mg O_2/l

Inóculo: .....

Resultado del ensayo

D_t = ... DBO expresado en % de DThO después de 28 días

o

D_t = ... DBO expresado en % de DQO después de 28 días

Validación de los resultados

Sustancia de referencia: .....

Resultado: ..... DBO expresado en 4 de DThO después de 28 días

Experimento de referencia nº: .....

Observaciones:

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: .....

Sustancia de ensayo: .....

Experimento nº: .....

A. *Determinaciones del oxígeno*

	Frasco nº	Análisis	mg O_2 después de × días			
			0	5	15	28
Solución nutritiva mineral sin sustancia de ensayo y sin inoculación	Control de O_2	c_1		—	—	—
		c_2		—	—	—
	Media	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Solución nutritiva mineral sin sustancia de ensayo pero con inoculación	1	c_3				
	2	c_4				
	Media blanca	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Solución nutritiva mineral con sustancia de ensayo y con inoculación	1	a_1				
	2	a_2				
	Media sustancia de ensayo	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B. *Consumo de O_2 (mg DBO/l) después de × días*

$DBO_x = (m_o - m_{bx}) - (m_o - m_{tx})$ (*)

mg DBO/l después de × días		
5	15	28

(*) Esta diferencia es importante para las pruebas de validez del ensayo.

C. *Evaluación*

$$D_t = \frac{\text{mg } DBO_x/l}{\text{mg } S_E \text{ (**)}/l} \cdot 100 \qquad \text{o} \qquad DBO_x/DCO = \frac{\text{mg } DBO_x/l}{\text{mg SE/l DCO}} \cdot 100$$

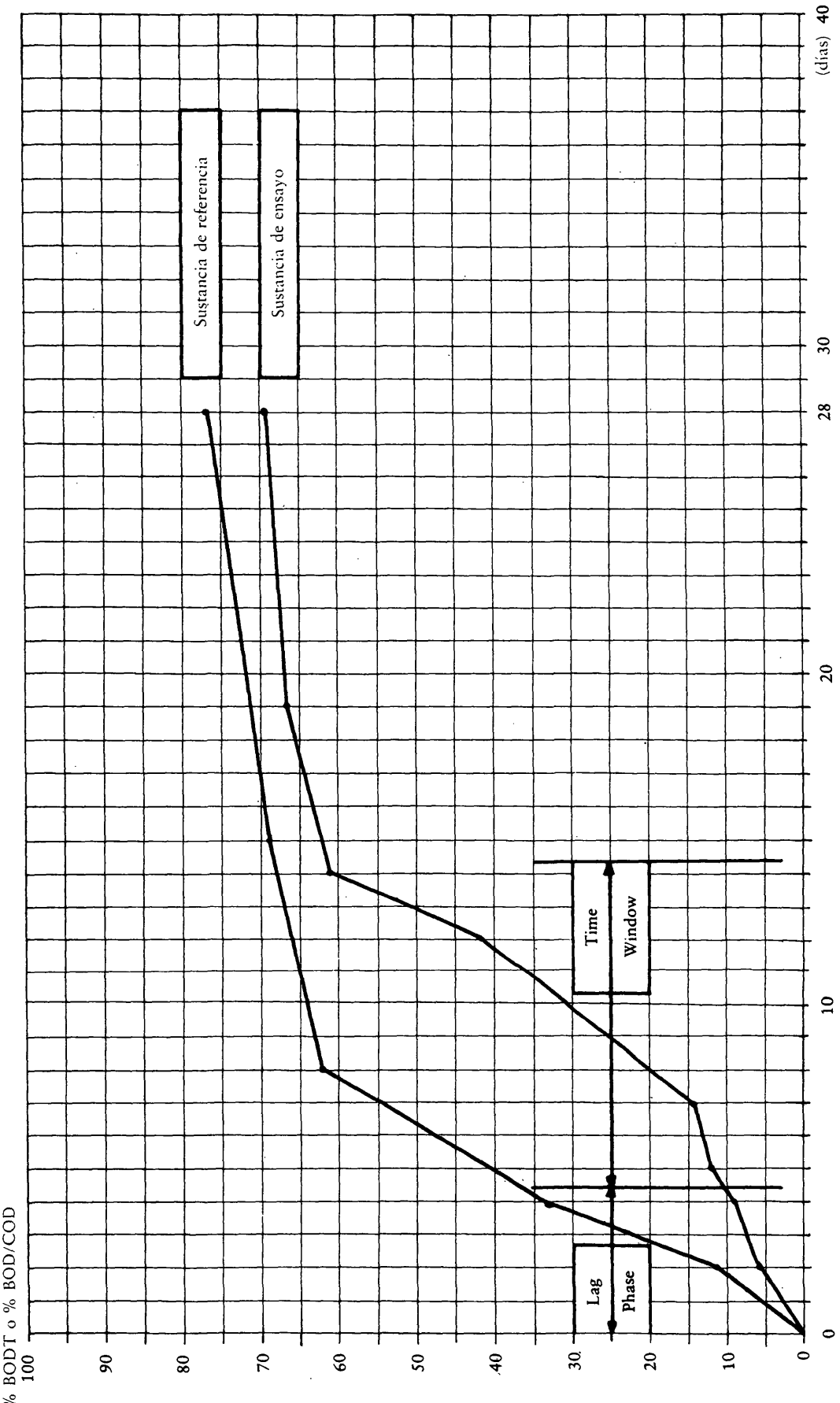
	Después de × días		
	5	15	28
% DBO/DThO			
% DBO_x/DCO			

(**) Sustancia de ensayo.

Apéndice 4

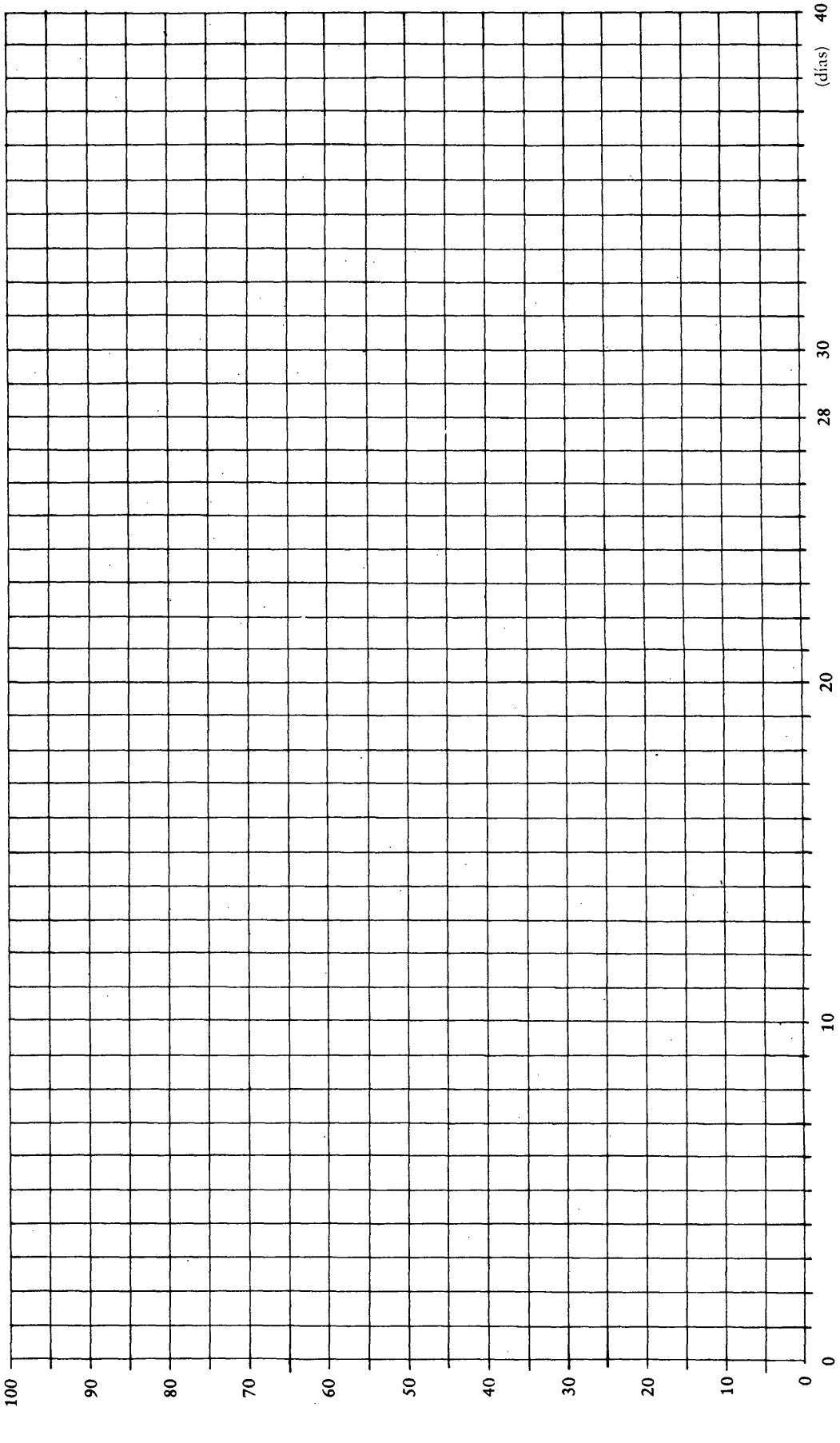
Ensayo em frasco cerrado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



Ensayo en frasco cerrado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



C.7. DEGRADACIÓN BIÓTICA: ENSAYO MITI MODIFICADO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo de este método de ensayo es medir la biodegradabilidad de las sustancias orgánicas en medio acuoso, por medio de un respirómetro que indica la demanda bioquímica de oxígeno.

Es conveniente disponer de la fórmula empírica del producto de ensayo para poder calcular la demanda teórica de oxígeno DThO; en su defecto, puede utilizarse la demanda química de oxígeno (DQO). El presente método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas que, a la concentración de ensayo:

— tienen una presión de vapor despreciable,

— no inhiben las bacterias,

— no están en contacto con el reabsorvente del CO_2 y no reaccionan con él.

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, para lograr una dispersión satisfactoria de la sustancia de ensayo.

Es conveniente conocer los efectos tóxicos de las sustancias químicas sobre los microorganismos para poder interpretar los resultados bajos y para elegir las concentraciones de ensayo adecuadas.

Para facilitar la interpretación de los resultados es conveniente disponer de información sobre las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia examinada.

1.2. Definiciones y unidades

$$\text{tasa de degradación} = \frac{\text{DBO} - \text{B}}{\text{DThO (o DQO)}} \times 100\ \%$$

o bien:

$$\text{tasa de degradación} = \frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100\ \%$$

donde:

DBO = Demanda bioquímica de oxígeno (experimental) (mg) del producto de ensayo, tal como se determina en la curva de DBO

B = Consumo de oxígeno (experimental) (mg) del medio de cultivo de base al cual se le añade el inóculo, tal como se determina en la curva de DBO

DThO = Demanda teórica de oxígeno para una oxidación completa (teórica) del producto de ensayo

Sa = Cantidad residual (experimental) (mg) de producto de ensayo al final del ensayo de biodegradabilidad

Sb = Cantidad residual (experimental) (mg) de producto de ensayo en el ensayo en blanco con agua a la que se habrá añadido únicamente el producto de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

A fin de verificar la actividad del inóculo, es conveniente utilizar sustancias de referencia, por ejemplo, la anilina, el acetato de sodio o el benzoato de sodio. Si la tasa de degradación de la anilina, calculada en función del consumo de oxígeno, no sobrepasa el 40 % después de 7 días y el 65 % después de 14 días, el ensayo puede considerarse nulo.

Si la degradación en el ensayo testigo (Sb baja) es importante, el ensayo también se considerará nulo.

1.4. **Principio del método**

Los productos de ensayo constituyen la única fuente de carbono orgánico en el medio y no hay adaptación previa de los microorganismos a los productos de ensayo.

Se utiliza un aparato automático para medir el consumo de oxígeno en circuito cerrado (aparato de medida de la DBO). Las sustancias químicas de ensayo se siembran con microorganismos en los recipientes de ensayo. Mientras dura el ensayo, se mide continuamente la demanda bioquímica de oxígeno con el aparato de medida de la DBO. Se calcula la biodegradabilidad basándose en la DBO y en un análisis químico complementario, como la medición de la concentración de carbono orgánico disuelto, de la concentración de los productos residuales, etc.

1.5. **Criterios cualitativos**

1.5.1. *Reproducibilidad*

Generalmente buena, especialmente para las sustancias químicas cuya solubilidad en el agua es superior a 0,1 gramo por litro.

1.5.2. *Sensibilidad*

A) Consumo de oxígeno: límite de detección = 1 miligramo (oxígeno consumido por los microorganismos).

B) Análisis químico: depende de la sensibilidad de las técnicas analíticas utilizadas.

1.5.3. *Especificidad*

Este método se aplica a cualquier sustancia no volátil para la que $(C)_{agua}/(C)_{aire} \geqslant 1$. Para los productos volátiles, es conveniente utilizar un «aparato de medida de la DBO modificado», que consiste en un aparato normal equipado con tubos capilares (ver Apéndice 1).

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. El agua destilada no debe contener más del 10 % del carbono orgánico aportado por la sustancia examinada.

1.6.1.2. Medio de cultivo de base

Tomar 3 mililitros de solución A, de solución B, de solución C y de solución D y añadir agua para completar hasta los 1 000 mililitros (utilizar agua desionizada en todos los casos).

A) PO_4K_2H (fosfato dipotásico):	21,75 g
PO_4KH_2 (fosfato monopotásico):	8,50 g
$PO_4HNa2{\cdot}7H_2O$ (fosfato disódico heptahidratado):	44,60 g

$ClNH_4$ (cloruro de amonio): 1,70 g
Disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).
El pH de la solución debe ser de 7,2.

B) $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): 22,50 g
Disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).

C) Cl_2Ca (cloruro de calcio): 27,50 g
Disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).

D) $Cl_3Fe.6H_2O$ (cloruro férrico (II) hexahidratado): 0,25 g
Disolver y completar hasta 1 000 ml con agua (1.6.1.1).

1.6.2. *Equipo*

Equipo para medir la DBO equipado con 6 frascos de 300 mililitros cada uno.

Frascos nº 1 y nº 2:

300 mililitros de agua desionizada, más 30 miligramos de sustancia de ensayo.

Frascos nº 3 y nº 4:

300 mililitros de medio de cultivo de base, más 9 miligramos de lodo activado (peso en seco), más 30 miligramos de sustancia de ensayo.

Frasco nº 5:

300 mililitros de medio de cultivo de base, más 9 miligramos de lodo activado (peso en seco), más 30 miligramos de anilina o de otra sustancia de referencia.

Frasco nº 6:

300 mililitros de medio de cultivo de base, más 9 miligramos de lodo activado (peso en seco).

1.6.3. *Preparación del inóculo*

1.6.3.1. Lodo activado

Procendencia de las muestras de lodo: en principio, las muestras de lodo se extraen de al menos 10 lugares diferentes repartidos por todo el país, principalmente en las zonas donde se utilicen y viertan una gran diversidad de sustancias químicas.

En Japón por ejemplo, el lodo activado estandar del Japonese Chemical Biotesting Centre está constituido por una mezcla de muestras obtenidas en los siguientes sitios:

— planta depuradora urbana: tres estaciones situadas en el norte, en el centro y en el sur del Japón,

— planta depuradora industrial: una estación destinada al tratamiento de las aguas usadas procedentes de industrias químicas,

— ríos: tres ríos situados al norte, en el centro y al sur del Japón,

— lago: un lago situado en el centro del Japón,

— mares: dos mares interiores del archipiélago.

Periodicidad de las extracciones de lodo: en principio, las muestras de lodos deben tomarse cuatro veces al año, en marzo, junio, septiembre y diciembre.

— todo para la preparación de muestras de lodos:

— aguas de alcantarilla: extraer 1 litro de lodo reciclado en la planta depuradora,

— ríos, lagos, pantanos o mares: extraer 1 litro de suelo superficial de los márgenes que estén en contacto con la atmósfera.

Preparación:

Colocar los lodos precedentes de diversos lugares en un recipiente, homogeneizar y dejar decantar. Quitar las materias extrañas que floten y pasar el sobrenadante por un papel filtro nº 2. Ajustar el pH del filtrado a 7,0 ± 1,0 con hidróxido de sodio o ácido fosfórico, después, trasvasar el filtrado a un recipiente de incubación y someterlo a una aeración.

Cultivo:

Después de unos 30 minutos de aeración, retirar alrededor de un tercio del volumen total del sobrenadante. Añadir un volumen igual de agua residual sintética al 0,1 % (agua residual sintética: disolver 1 gramo de glucosa, 1 gramo de peptona y 1 gramo de monofosfato de potasio en 1 litro de agua, ajustar el pH de la solución a 7,0 ± 1,0 con hidróxido de sodio) al resto de sobrenadante y airear de nuevo la mezcla. Repetir la operación todos los días. La incubación se hace a 25 ± 2ºC.

Control:

Para controlar el cultivo, verificar los siguientes parámetros y efectuar los ajustes que sean necesarios:

— aspecto del sobrenadante: debe ser claro,

— propiedades de decantación del lodo activado: el lodo activado en grandes copos debe tener buenas propiedades de decantación,

— estado de formación del lodo activado: en caso de que no se observara el desarrollo de copos habría que aumentar o el volumen del agua residual sintética al 0,1 % o la frecuencia de adición de la misma,

— el pH del sobrenadante debe ser de 7,0 ± 1,0,

— temperatura: la temperatura de incubación del lodo es de 25ºC ± 2ºC,

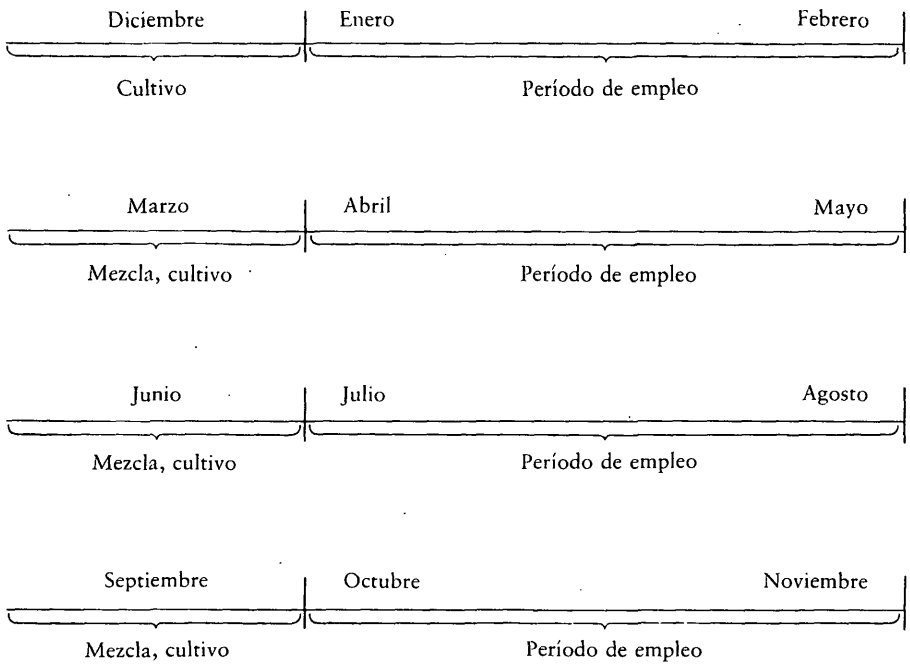
— grado de aeración: al sustituir el sobrenadante por el agua residual sintética, la suspensión contenida en el recipiente de cultivo debe estar bastante aireada para que la concentración de oxígeno disuelto en la solución se mantenga en un valor superior a 5 miligramos por litro,

— microflora del lodo activado: la observación del lodo activado al microscopio (x100 a x400) debe permitir descubrir, además de los copos, cierto número de protozoos de distintas especies,

— mezcla de lodos activados frescos y maduros: para conservar la misma actividad en los lodos activados frescos y maduros, debe mezclarse el filtrado del sobrenadante de un lodo activado utilizado para el ensayo con volumen igual de sobrenadante de un lodo activado recién extraido y, a continuación, se pone la mezcla en incubación,

— control de la eficacia del lodo activado: verificar periódicamente, es decir, al menos una vez cada tres meses, la eficacia del lodo activado con sustancias estandar y aplicando el método descrito más adelante. La actividad de los lodos maduros se verificará especialmente cuando se mezclen lodos activados frescos y maduros.

Ejemplo de preparación de muestras de lodos activados y período de utilización:



(y así sucesivamente)

1.6.4. *Preparación del producto de ensayo*

Si el producto de ensayo no es soluble en el agua a la concentración requerida para el ensayo, es conveniente pulverizarlo lo más fino posible.

1.6.5. *Adición del producto de ensayo y preparación para el ensayo*

Preparar los recipientes de ensayo siguientes y ponerlos a la temperatura de ensayo (ver punto 1.6.2).

1) Dos recipientes de ensayo con agua a la que se le habrá añadido 100 miligramos por litro de sustancia de ensayo (recipientes 1 y 2).

2) Dos recipientes de ensayo con el medio de cultivo de base al que se le habrá añadido 100 miligramos por litro de sustancia de ensayo; si es preciso, ajustar el pH de esta solución a 7 antes de sembrar con lodo activado (recipientes 3 y 4).

3) Un recipiente de ensayo con el medio de cultivo de base al que se le habrá añadido 100 miligramos por litro de anilina o de cualquier otra sustancia de referencia (recipiente 5).

4) Un recipiente para el ensayo en blanco conteniendo únicamente el medio de cultivo de base (recipiente 6).

1.6.5.1. Siembra del lodo activado

Añadir el inóculo en los recipientes de ensayo 3, 4, 5 y 6 hasta que la concentración de materias en suspensión definidas por las normas industriales japonesas (3) por ejemplo, sea igual a 30 miligramos por litro.

1.6.5.2. Condiciones del ensayo

Concentración de productos de ensayo: 100 miligramos por litro.

Concentración de lodos activados: 30 miligramos por litro.

Temperatura de ensayo: 20 a 20°C.

Duración del ensayo: 28 días.

Efectuar el ensayo en la obscuridad. Verificar diariamente la temperatura así como los cambios de color que se produzcan en el recipiente de incubación.

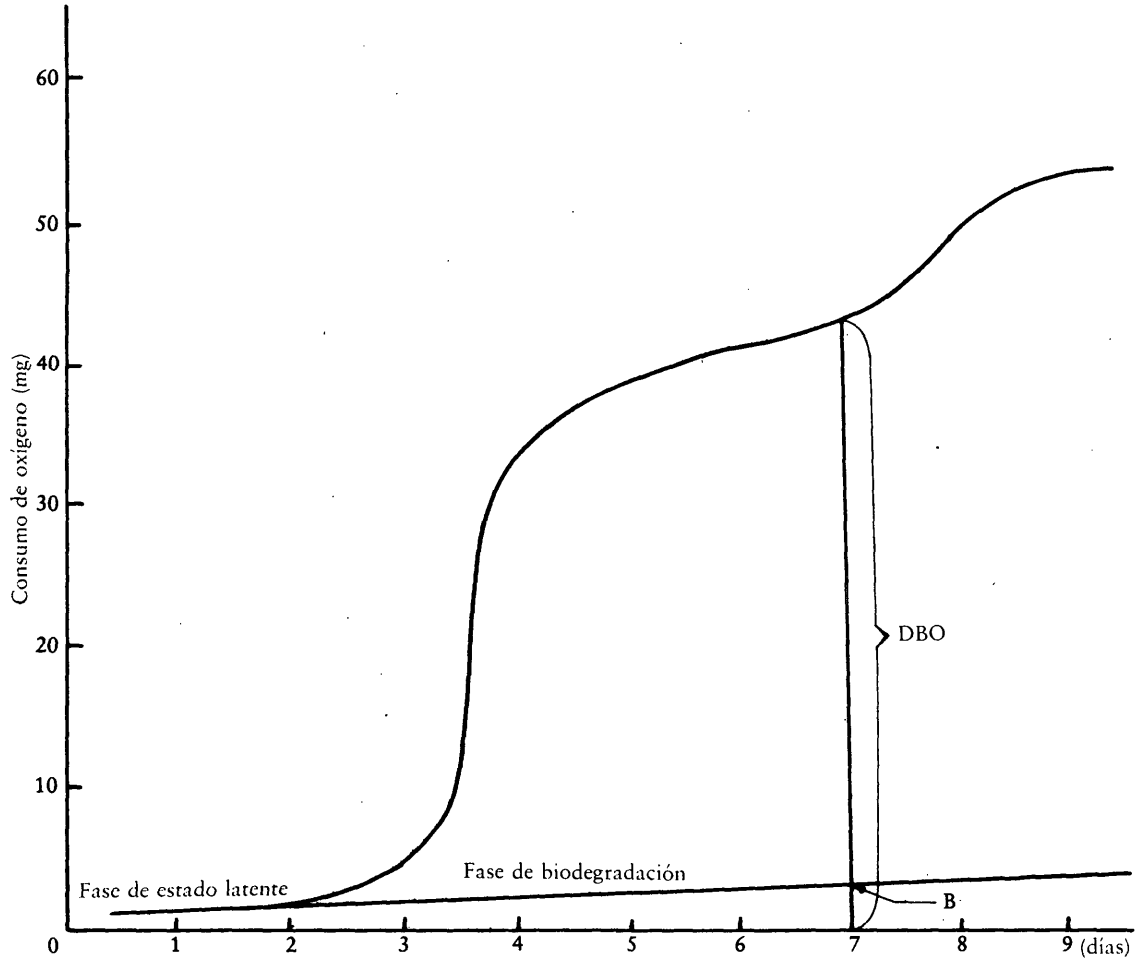
Homogeneizar las soluciones de ensayo mediante un agitador mecánico.

1.6.6. *Procedimiento*

La curva de evolución de la DBO se registra de forma de línea continua durante 28 días (ver figura). A los 28 días de ensayo, medir el pH y la concentración de productos químicos residuales e intermedios que se encuentren en los recipientes de ensayo.

Figura

Curva de DBO de la anilina



Analizar igualmente los productos de ensayo del recipiente que no contiene lodo activado a fin de descubrir cualquier cambio que se haya producido en el producto durante el período de ensayo o cualquier pérdida del producto original por evaporación o absorción por las paredes del recipiente de ensayo, etc.

1.6.7. *Equipo analítico*

Si la sustancia a examen es soluble en el agua, también es conveniente determinar la cantidad residual de carbono orgánico total al final del ensayo.

a) Si se utiliza un aparato para determinar el carbono orgánico total:

extraer 10 mililitros de solución de ensayo del recipiente y centrifugar a 3 000 g durante 5 minutos. Medir a continuación la cantidad residual de carbono orgánico total en el sobrenadante por medio de un equipo para determinar el carbono orgánico total.

b) En caso de utilización de otros equipos:

extraer la sustancia de ensayo mediante un disolvente adecuado operando sobre el contenido total del recipiente de ensayo, y después de un tratamiento conveniente, por ejemplo, concentración, determinar la cantidad residual de sustancia de ensayo por medio de un intrumento de análisis (cromatografía gaseosa, espectrometría de masa, espectrofotometría, etc.).

Por lo que se refiere a los productos volátiles, el baño termostatizado del aparato para medir el DBO debe estar enfriado a 10°C y mantenido a esta temperatura durante 30 minutos por lo menos, para impedir la evaporación. Proceder a continuación a los análisis a) y b).

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

2.1. Tratamiento de los resultados

Los métodos de cálculo de la tasa de biodegradación a partir del consumo de oxígeno y a partir de los resultados del análisis directo se exponen en el punto 1.2.

2.2. Evaluación de los resultados

La demanda teórica de oxígeno puede calcularse tal como se indica en el Apéndice 2 o según el procedimiento MITI original:

Elemento:	*Forma oxidada:*
C	CO_2
H	H_2O
N	NO_2
S	SO_2
X (halógeneo)	X

3. INFORME

3.1. Informe del ensayo

Se procurará incluir lo siguiente:

— información sobre los productos químicos de ensayo: nombre, estructura, peso molecular, pureza, naturaleza de las impurezas, propiedades fisicoquímicas, identificación de la sustancia,

— condiciones del ensayo,

— inóculo: lugar de extracción y concentración de los lodos activados,

— sustancia de ensayo: concentración,

— duración del ensayo,

— temperatura de ensayo,

— técnica analítica:

tratamiento previo,
cualidades analíticas de los instrumentos,
eficacia del análisis,
identificación de los productos intermedios,

— resultados:

curvas de biodegradación (control de la actividad del inóculo, más curva de la sustancia)

DBO (mg)
B (mg)
Sa (mg)
Sb (mg)
DThO (mg)

tasa de degradación obtenida por determinación de la DBO, tasa de degradación obtenida por análisis químico, cromatogramas o espectros de los productos de ensayo obtenidos y utilizados para el análisis,

— prueba de validez (ver punto 1.3).

3.2. **Interpretación de los resultados**

Es conveniente verificar que las sustancias no contengan nitrógeno que pueda influir en los resultados.

Si la tasa de recuperación de Sb es del orden del 10 %, o inferior, es una señal de que existen problemas analíticos o, por ejemplo, una hidrólisis; en tales casos hay que ser extremadamente prudente en la interpretación de los resultados.

Dado que se trata de un ensayo riguroso, un resultado bajo no significa, necesariamente, que la sustancia de ensayo no sea biodegradable en condiciones ambientales, sino, simplemente que hay que proceder a estudios complementarios para comprobarlo.

Los productos que, en el presente ensayo, muestren un fuerte consumo de oxígeno, se considerarán fácilmente biodegradables, a condición de que dicho nivel de consumo lo alcancen dentro de los 10 días siguientes a aquel en que, por primera vez, el nivel de biodegradación observado sobrepase el 10 %.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París,1981, Test Guideline 301C. Decision of the Council C (81) 30, Final.

(2) Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.

(3) The chemical substances control law in Japan (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.

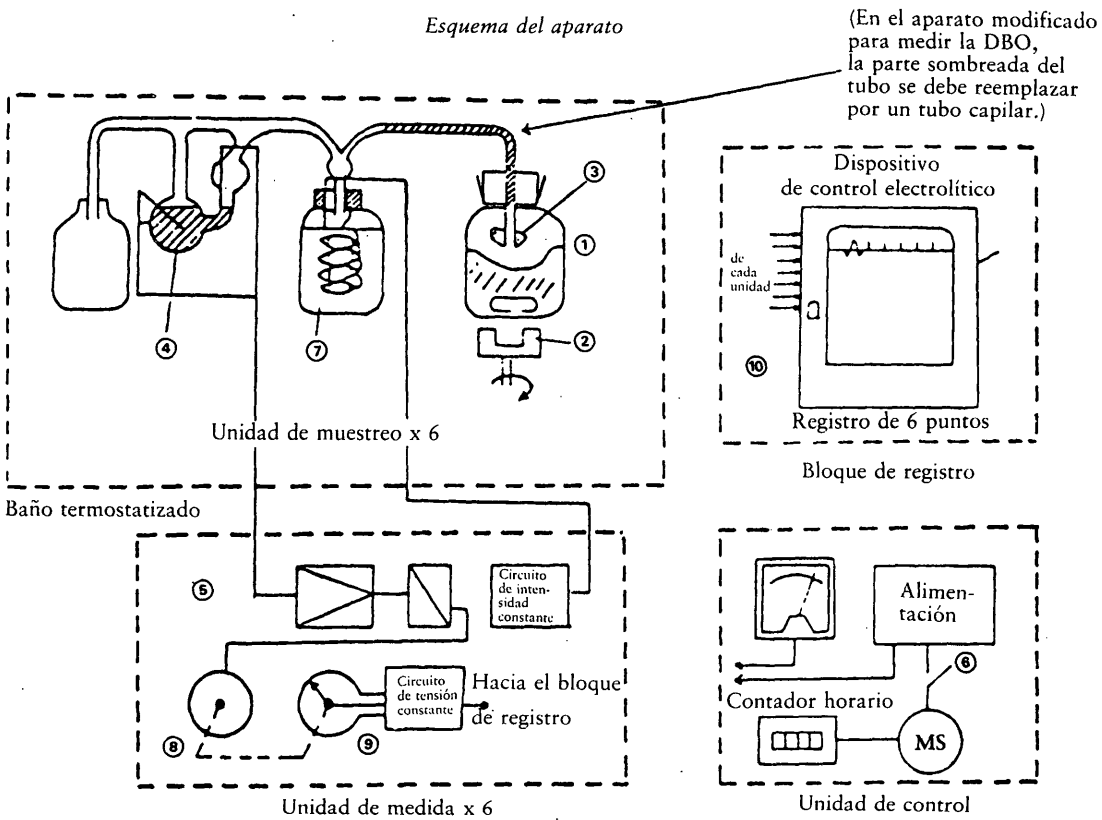
(4) The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5, 8 (C-3/78/JAP), 1978.

Apéndice 1

Principio de funcionamiento del aparato para medir el consumo de oxígeno en circuito cerrado

La cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos puede determinarse mediante un procedimiento de análisis electroquímico (por ejemplo, culombimetría).

Esquema del aparato



El medio contenido en el frasco de incubación (1) se homogeneiza por medio del agitador mecánico (2). A medida que la reacción progresa, se consume el oxígeno disuelto en el líquido. El oxígeno (O_2) presente en el espacio superior del frasco de incubación se disuelve en el líquido, generándose CO_2.

Cuando el CO_2 es absorbido por la cal de sodio (3), disminuyen la presión parcial de oxígeno en el frasco y la presión total.

La disminución de la presión es detectada y convertida en señal eléctrica por el manómetro de electrodo (4) y amplificada por el amplificador (5), para accionar el relé (6), lo cual provoca la puesta en marcha del motor síncrono (8). Simultáneamente, bajo la acción de una corriente de intensidad constante, se produce oxígeno por electrólisis a partir de la solución de cobre en ácido sulfúrico contenida en la cubeta de electrólisis (7).

El oxígeno se envía al frasco de incubación y el restablecimiento de la presión que resulta es detectado por el manómetro, desconectándose el circuito y parándose el motor síncrono que activa la electrólisis.

En el frasco de incubación, el espacio situado por encima del líquido se mantiene siempre a una presión de oxígeno constante y la cantidad de oxígeno consumido en el frasco de incubación es proporcional a la cantidad de oxígeno producido por electrólisis, siendo esta última, a su vez, proporcional a la duración de la electrólisis dado que la corriente electrolítica es constante.

Mediante un potenciómetro de interbloqueo, el ángulo de revolución del motor síncrono (9) se transforma en una señal en mV que aparece en el registro (10) e indica la cantidad de oxígeno consumido.

Apéndice 2

Cálculo de la demanda bioquímica teórica de oxígeno

La DThO del compuesto $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de peso molecular PM se calcula aplicando la siguiente relación:

$$DThO_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Esta relación implica que C se mineraliza en CO_2, H en H_2, H en H_2O, P en P_2O_5 y Na en Na_2O. El halógeno se elimina en forma de halogenuro de hidrógeno y el nitrógeno en forma de amoniaco.

Ejemplo:

glucosa $C_6H_{12}O_6$, PM = 180

$$DThO = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucosa.}$$

Para el cálculo de los pesos moleculares de las sales distintas a las de los metales alcalinos, se supone que dichas sales han sido hidrolizadas.

El azufre se supone oxidado al estado de + 6.

Ejemplo:

n-alkilbencenosulfonato de sodio, $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$DThO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg de sustancia.}$$

En el caso de los compuestos que contengan nitrógeno, éste puede eliminarse en forma de amoniaco, de nitrito o de nitrato, según las diferentes demandas bioquímicas teóricas de oxígeno.

$$DThO_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

$$DThO_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Suponiendo que una formación total de nitrato haya sido observada por análisis, por ejemplo en el caso de una amina secundaria:

$(C_{12}H_{25})_2NH$; PM = 353

$$DThO_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg de sustancia.}$$

Apéndice 3

Degradación biótica: ensayo MITI modificado (formulario)

Laboratorio: .....

Responsable del ensayo: .....

Fecha de inicio del ensayo: ..... Experimento nº: .....

Sustancia de ensayo: .....

Composición química: .....

Análisis: .....

DThO o DQO de la sustancia de ensayo: .....

Inóculo: .....

Lugar de procedencia de las muestras: .....

Concentración: .....

Resultado del ensayo

..... % degradación = $\frac{\text{DBO} - \text{B}}{\text{DThO}} \times 100$ % después de 28 días

..... % degradación = $\frac{\text{DBO} - \text{B}}{\text{DQO}} \times 100$ % después de 28 días

..... % degradación = $\frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100$ % después de 28 días

Validación de los resultados

Control químico: .....

Resultado: ..... % de degradación después de 28 días .....

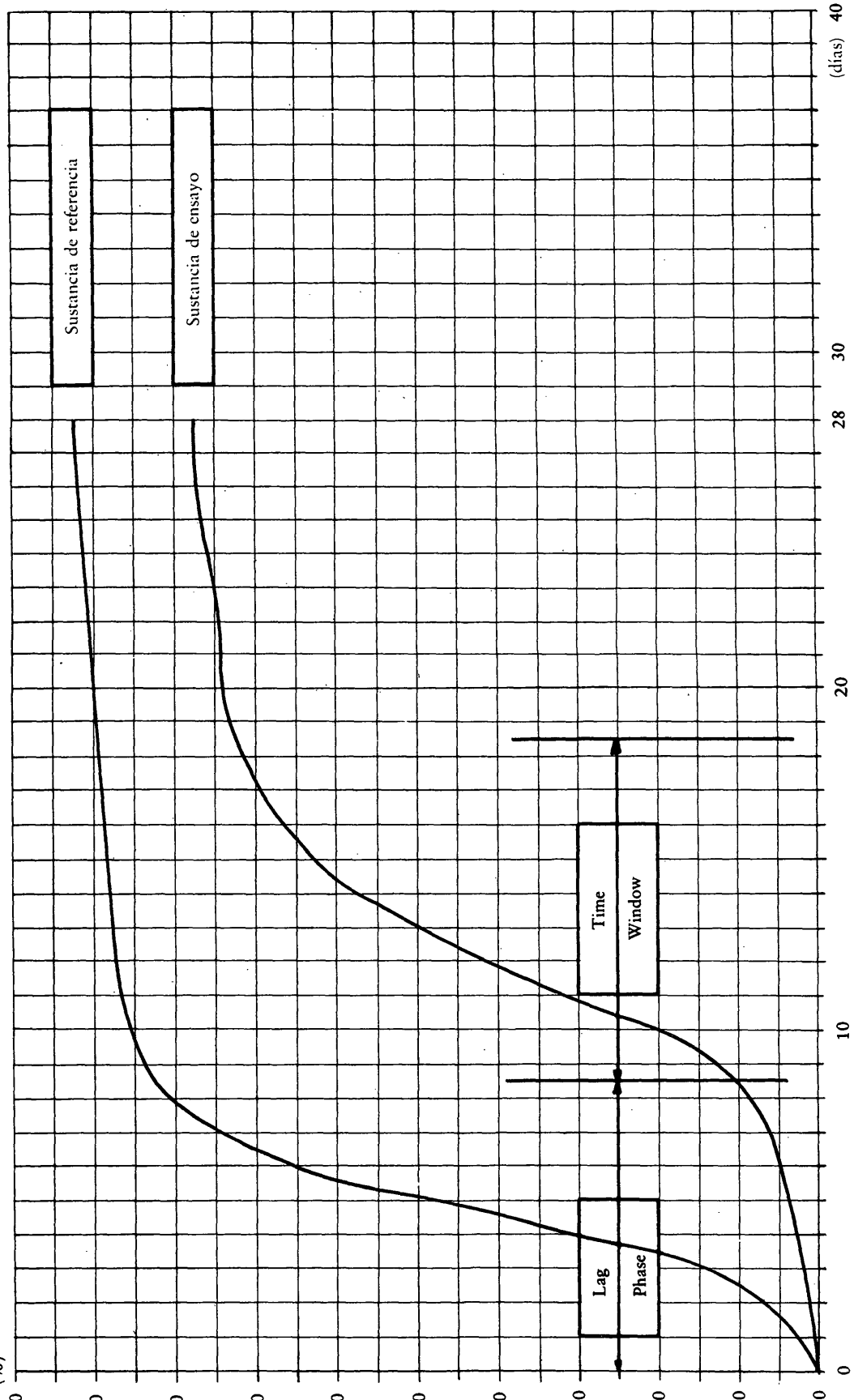
Experimento de referencia nº: .....

Observaciones

Apéndice 4

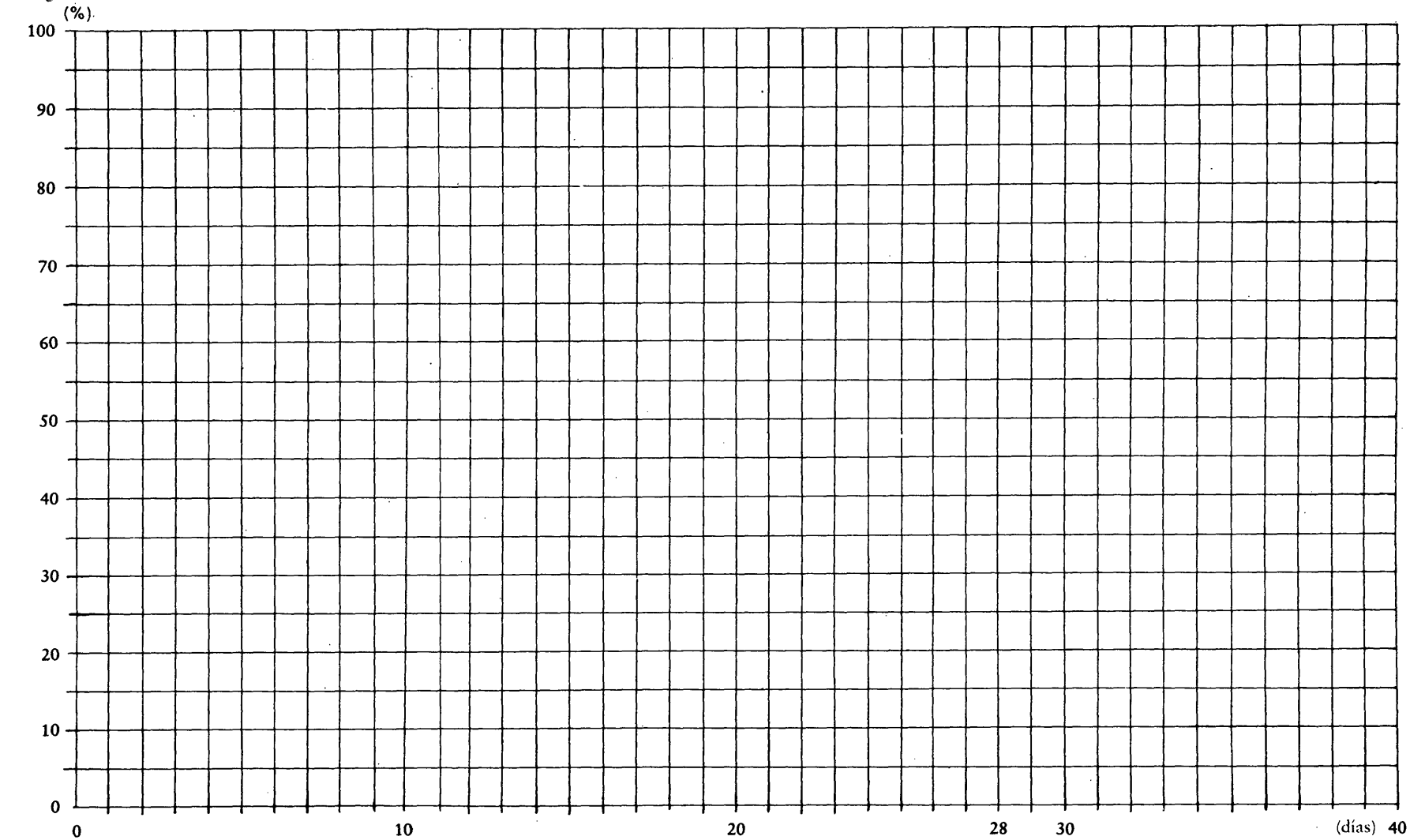
Ensayo MITI modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



Ensayo MITI modificado

Organismo o empresa que efectúa el ensayo: ..... Sustancia de ensayo: ..... Experimento nº: .....



C . 8. DEGRADACIÓN: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método 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 y, 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. Definición 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 gramos de sustancia sujeta a prueba.

1.3. Sustancia de referencia

No pueden recomendarse sustancias de referencia.

Es conveniente la utilización de una sustancia química testigo apropiada para verificar la actividad del inóculo.

1.4. Principio del método de ensayo

Sembrar con microorganismos e incubar en la obscuridad a una temperatura ambiente constante dada, una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en un medio aireado, apropiado.

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 cualitativos

La determinación de la DBO no puede considerarse como un ensayo válido de determinación de la biodegradabilidad de una sustancia, sino como un ensayo orientativo.

1.6. Descripción del método de ensayo

Preparar 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 normalizado que sea apropiado, puesto que todavía no hay ningún acuerdo en cuanto a la aplicación de un método internacional.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

La DBO contenida en la solución preliminar se calcula según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DBO por gramos 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 los referentes a impurezas, estado físico, efectos tóxicos y composición de la sustancia, que pueden 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, 1981, Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London.

C. 9. DEGRADACIÓN: DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

1. MÉTODO

1.1. Introducción

El objetivo del método 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 de hierro de compuestos orgánicos, compuestos organoclorados).

1.2. Definición y unidades

La demanda química de oxígeno es la medida de la oxidabilidad de una sustancia, definida como la cantidad de oxígeno de un reactivo oxidante, consumido 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 (el catalizador es sulfato de plata) en caliente y con reflujo durante dos horas. El dicromato residual se valora con ayuda de sulfato de hierro y de amonio valorado.

En el caso de las sustancias con cloro, se debe añadir sulfato de mercurio para atenuar la interferencia de los cloruros.

1.5. Criterios cualitativos

Dada la arbitrariedad del método de determinación de la DQO, ésta debe considerarse más como un «indicador Redox» que como una evaluación de la sustancia orgánica.

Los cloruros pueden interferir en el desarrollo del ensayo; otras sustancias minerales reductoras u oxidantes pueden influir igualmente en la determinación de la DQO.

Algunos compuestos cíclicos no se oxidan totalmente durante el ensayo.

1.6. Descripción del método de ensayo

Preparar una solución o una dispersión preliminar de la sustancia para conseguir una DQO de 250 a 600 miligramos por litro.

Nota:

Cuando se trata de sustancias poco solubles y que no se dispersan, pesar una cantidad de sustancia finamente pulverizada, o en estado líquido, correspondiente a unos 5 miligramos de DQO, e introducirla en el aparato experimental añadiendo agua.

Determinar a continuación la DQO aplicando cualquier método nacional normalizado, que sea adecuado. Cuando se publique un método internacional normalizado su aplicación será prioritaria.

2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

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 interpretación de los resultados, especialmente los referentes a impurezas, estado físico y propiedades específicas de la sustancia (si se conocen) que pueden afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se ha usado sulfato mercúrico para reducir la interferencia de los cloruros.

4. BIBLIOGRAFÍA

Ejemplos de métodos normalizados:

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	Determinación de la demanda química de oxígeno
DS 217 — Water Analysis	Determination of the Chemical Oxygen Demand
DIN 38409 — H — 41	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15mg/l
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik
ISO DP 6060	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods

C.10. 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 *pseudo* primer orden, por lo tanto, los tiempos de vida media 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 solubles. Las impurezas, por regla general, influirán en los resultados.

El comportamiento hidrolítico de las sustancias químicas debería estudiarse con los valores de pH más normales en el medio ambiente (pH 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 característico del radical X con OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

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 el agua presente excede en mucho a la sustancia química, este tipo de reacción se describe normalmente como una reacción de *pseudo* primer orden durante la cual 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

$$K_{obs} = \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_o}{C_t} \qquad [4]$$

donde:

t = tiempo

C_o = concentración de la sustancia en tiempo O

C_t = concentración de la sustancia en 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 unidad de la constante k_{obs} es el (tiempo)$^{-1}$.

El tiempo de vida media $t_{1/2}$ se define como el tiempo necesario para reducir en un 50 % la concentración de la sustancia química de ensayo, es decir:

$$C_t = 1/2 \cdot C_O \qquad [5]$$

De la expresión [4] y [5] se puede deducir que

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \qquad [6]$$

1.3. **Sustancias de referencia**

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se estudia una nueva sustancia. Deberían servir esencialmente para controlar de vez en cuando la eficacia del método y permitir la comparación de los resultados cuando se utiliza otro método distinto.

El ácido acetilsalicílico (Aspirina) y el 0,0-dietil 0-2 isopropil-4-metil-pirimidiltiofosfato (Dimpilato, Diazinon), se han utilizado como sustancias de referencia (1).

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 en el tiempo se llevan a una gráfica y, si da una recta, puede obtenerse la constante de velocidad de primer orden por la inclinación de la misma (ver punto 2).

Cuando no se pueda determinar inmediatamente una constante de velocidad para una temperatura determinada normalmente, el valor de esta constante se estima 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 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 cualitativos**

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 concentración en oxígeno disuelto; la presencia de microorganismos puede influir en la repetibilidad.

1.6. **Descripción del método**

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. Soluciones tampón

El ensayo se efectúa con tres valores de pH: 4,0, 7,0 y 9,0.

Para ello deberán prepararse soluciones tampón utilizando reactivos químicos de pureza analítica y agua destilada o desionizada estéril.

En el Apéndice se presentan algunos ejemplos de soluciones tampón.

La solución tampón 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 los fosfatos.

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 el tampón elegido a una concentración que no sobrepase el 0,01 M o a la mitad de la concentración de saturación.

La utilización de disolventes orgánicos miscibles en el agua sólo se recomienda para las sustancias poco solubles en el agua. 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 el 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. *Mtodo analítico*

El método analítico se elegirá en función de la naturaleza de la sustancia de ensayo y será suficientemente sensible para detectar una disminución del 10 % de la concentración inicial.

El método debe ser específico a la sustancia de ensayo y a las concentraciones de la solución de ensayo y puede consistir en una combinación de varios métodos analíticos apropiados.

1.6.4. *Condiciones del ensayo*

Los ensayos se realizarán utilizando un recinto termostático controlado o un baño a temperatura constante a ± 5°C de la temperatura elegida. Se mantendrá la temperatura y se medirá a ± 0,1°C. Las interferencias fotolíticas deberán evitarse por medios adecuados.

Deberán adoptarse todas las precauciones necesarias para eliminar el oxígeno disuelto (por ejemplo, borboteando azufre o argón durante 5 minutos antes de preparar las soluciones).

1.6.5. *Procedimiento de ensayo*

1.6.5.1. Ensayo preliminar

Deberá hacerse un ensayo preliminar para todas las sustancias a 50°C ± 5°C con tres valores de pH: 4,0, 7,0 y 9,0.

Se tomarán 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 vida media ($t_{1/2}$) es inferior a 2,4 horas, o si menos del 10 % de la hidrólisis se observa al cabo de 5 días. (Se puede considerar que estos valores corresponden, respectivamente, a tiempos de vida media inferiores a un día o superiores a un año en condiciones más representativas que las del medio ambiente (25°C)).

Si el ensayo preliminar indica que, para cada valor de pH, el 50 %, o más, de la sustancia de ensayo ha sido hidrolizada en 2,4 horas a 50°C, o que menos del 10 % ha sido hidrolizado al cabo de 5 días, no es necesario 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 ± 5°C y, si fuera posible, en condiciones estériles, con los valores de pH que en los ensayos preliminares han mostrado la necesidad de efectuar ensayos suplementarios.

Para determinar el comportamiento de *pseudo* primer orden a los valores de pH específicos, 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 *pseudo* primer orden.

Si los resultados del ensayo nº 1 no permiten determinar con certeza que la reacción es de *pseudo* 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 *pseudo* 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 (ver 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 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 vida media ($t_{1/2}$).

1.6.5.4. Ensayo nº 3

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 40ºC,

— o a dos temperaturas por encima de los 50ºC, con una diferencia de 10ºC, 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 O y el segundo y tercero cuando los porcentajes de hidrólisis sean superiores al 30 %; deberán calcularse la constante k_{obs} y el $t_{1/2}$

2. RESULTADOS

En el caso de un comportamiento de *pseudo* 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:

$$k_{obs} = - \text{ pendiente x } 2{,}303$$

Además, $t_{1/2}$ puede calcularse según la ecuación [6]. Estimar k_{25}ºC aplicando la ecuación de Arrhenius cuando sea apropiado.

En el caso de que el comportamiento no sea de *pseudo* primer orden, ver el punto 3.1.

3. INFORME

3.1. **Informe del ensayo**

Se procurará incluir lo siguiente:

— las especificaciones de la sustancia,

— cualquier resultado que se obtenga con sustancias de referencia,

— el principio y la descripción completa del método analítico empleado,

— para cada ensayo: las temperaturas, el valor del pH, la composición del tampón y la tabla de los puntos experimentales concentración-tiempo,

— en el caso de las reacciones de *pseudo* primer orden, los valores de k_{obs}, del $t_{1/2}$ y sus métodos de cálculo,

— en el caso de una reacción que no sea de *pseudo* 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 25ºC) de sustancia de ensayo, siempre que ya existan valores de energía de activación para homólogos de la sustancia química y siempre que pueda estimarse razonablemente que la energía de activación de la sustancia de ensayo es de igual magnitud.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, Paris, 1981, Test guideline 111. Decision of the Council, C (81) 30 Final.

(2) OCDE, Paris, 1981, Test guideline 111 ref. (2). Decision of the Council C (81) 30 Final.

Apéndice

Mezcla tampón

A. CLARK Y LUBS

Los valores de pH que se indican han sido calculados a partir de medidas potenciales utilizando las ecuaciones estandar de Sörensen (1909). Los valores reales de pH son 0,4 unidades más elevados que los valores de la tabla.

Composición	*pH*
0,1 M de ftalato de ácido de potasio + 0,1 N ClH a 20°C	
2,63 ml 0,1 N ClH + 50 ml de ftalato, completar hasta 100 ml	3,8
0,1 M de ftalato de ácido de potasio + 0,1 N NaOH a 20°C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de ftalato, completar hasta 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de ftalato, completar hasta 100 ml	4,2
0,1 M de fosfato monopotásico + 0,1 N NaOH a 20°C	
23,45 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de fosfato, completar hasta 100 ml	6,8
29,63 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de fosfato, completar hasta 100 ml	7,0
35,00 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de fosfato, completar hasta 100 ml	7,2
0,1 M BO_3H_3 en 0,1 M ClK + 0,1 N NaOH a 20°C	
16,30 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de ácido bórico, completar hasta 100 ml	8,8
21,30 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de ácido bórico, completar hasta 100 ml	9,0
26,70 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de ácido bórico, completar hasta 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF Y VLEESCHOUWER

Composición	*pH*
0,1 M de citrato monopotásico y 0,1 N NaOH a 18°C (añadir un cristal de timol o algunos miligramos de ioduro mercúrico para evitar la formación de mohos).	
2,00 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de citrato, completar hasta 100 ml	3,8
9,00 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de citrato, completar hasta 100 ml	4,0
16,30 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de citrato, completar hasta 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M bórax + 0,1 N ClH

Composición		pH			
ml de bórax	ml de ClH	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

0,05 M bórax + 0,1 N NaOH

Composición		pH			
ml de bórax	ml NaOH	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