Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►**B**

REGLAMENTO (CE) Nº 440/2008 DE LA COMISIÓN

de 30 de mayo de 2008

por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(DO L 142 de 31.5.2008, p. 1)

Modificado por:

		Diario Oficial		
		n°	página	fecha
►**M1**	Reglamento (CE) nº 761/2009 de la Comisión de 23 de julio de 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Reglamento (UE) nº 1152/2010 de la Comisión de 8 de diciembre de 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Reglamento (UE) nº 640/2012 de la Comisión de 6 de julio de 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Reglamento (UE) nº 260/2014 de la Comisión de 24 de enero de 2014	L 81	1	19.3.2014

Rectificado por:

►**C1** Rectificación, DO L 314 de 14.11.2012, p. 47 (640/2012)

▼B

REGLAMENTO (CE) Nº 440/2008 DE LA COMISIÓN

de 30 de mayo de 2008

por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión [1], y, en particular, su artículo 13, apartado 3,

Considerando lo siguiente:

(1) De acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006, han de adoptarse a nivel comunitario métodos aplicables a los ensayos que sea necesario hacer con sustancias para obtener información sobre las propiedades intrínsecas de dichas sustancias.

(2) La Directiva 67/548/CEE del Consejo, de 27 de junio de 1967, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas [2], establece en su anexo V métodos de ensayo para la determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de las sustancias y preparados. El anexo V de la Directiva 67/548/CEE ha sido suprimido por la Directiva 2006/121/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, con efecto a partir del 1 de junio de 2008.

(3) Los métodos de ensayo incluidos en el anexo V de la Directiva 67/548/CEE deben incorporarse al presente Reglamento.

(4) El presente Reglamento no excluye el uso de otros métodos de ensayo, siempre que su uso se ajuste a lo establecido en el artículo 13, apartado 3, del Reglamento (CE) nº 1907/2006.

[1] DO L 396 de 30.12.2006, p. 1; versión corregida en el DO L 136 de 29.5.2007, p. 3.

[2] DO 196 de 16.8.1967, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/121/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 396 de 30.12.2006, p. 853; versión corregida en el DO L 136 de 29.5.2007, p. 281).

▼B

(5) Al elaborar los métodos de ensayo, se han de tener plenamente en cuenta los principios de sustitución, reducción y perfeccionamiento de la experimentación con animales, sobre todo cuando se llegue a disponer de métodos validados adecuados para sustituir, reducir o perfeccionar los ensayos con animales.

(6) Las disposiciones del presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité establecido de conformidad con el artículo 133 del Reglamento (CE) nº 1907/2006.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Los métodos de ensayo que deben aplicarse a efectos del Reglamento (CE) nº 1907/2006 se recogen en el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

La Comisión revisará, cuando proceda, los métodos de ensayo incluidos en el presente Reglamento con el fin de sustituir, reducir o perfeccionar los ensayos con animales vertebrados.

Artículo 3

Todas las referencias al anexo V de la Directiva 67/548/CEE se entenderán hechas al presente Reglamento.

Artículo 4

El presente Reglamento entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de junio de 2008.

▼B

ANEXO

PARTE A: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

ÍNDICE

A.1. PUNTO DE FUSIÓN/CONGELACIÓN

A.2. PUNTO DE EBULLICIÓN

A3. DENSIDAD RELATIVA

A.4. PRESIÓN DE VAPOR

A.5. TENSIÓN SUPERFICIAL

A.6. HIDROSOLUBILIDAD

A.8. COEFICIENTE DE REPARTO

A.9. PUNTO DE INFLAMACIÓN

A.10. INFLAMABILIDAD (SÓLIDOS)

A.11. INFLAMABILIDAD (GASES)

A.12. INFLAMABILIDAD (EN CONTACTO CON EL AGUA)

A.13. PROPIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS Y LÍQUIDOS

A.14. PROPIEDADES EXPLOSIVAS

A.15. TEMPERATURA DE AUTOINFLAMACIÓN (LÍQUIDOS Y GASES)

A.16. TEMPERATURA RELATIVA DE AUTOINFLAMACIÓN DE SÓLIDOS

A.17. PROPIEDADES COMBURANTES (SÓLIDOS)

A.18. PESO MOLECULAR MEDIO EN NÚMERO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LOS POLÍMEROS

A.19. CONTENIDO DE SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN LOS POLÍMEROS

A.20. COMPORTAMIENTO DE DISOLUCIÓN/EXTRACCIÓN

A.21. PROPIEDADES COMBURENTES (LÍQUIDOS)

A.22. DIÁMETRO MEDIO GEOMÉTRICO DE LAS FIBRAS PONDERADO POR LA LONGITUD

▼M4

A.23. COEFICIENTE DE REPARTO (1-OCTANOL/AGUA): MÉTODO DE AGITACIÓN LENTA

▼B

A.1. PUNTO DE FUSIÓN/CONGELACIÓN

1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y {3).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos y los aparatos descritos a continuación se utilizan para determinar el punto de fusión de los productos químicos, cualquiera que sea su grado de pureza.

La selección del método dependerá de la naturaleza de la sustancia problema. En consecuencia, el factor limitante dependerá de que la sustancia sea fácil, difícilmente o no pulverizable.

En determinadas sustancias será preferible determinar el punto de congelación o de solidificación; las normas para proceder a dichas determinaciones también se recogen en el presente método.

Cuando, debido a propiedades especiales de la sustancia, no pueda medirse convenientemente ninguno de los parámetros mencionados, puede ser adecuado medir el punto de fluidez.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El punto de fusión se define como la temperatura a la que se produce la transición de fase del estado sólido al líquido a presión atmosférica normal; esta temperatura corresponde idealmente a la temperatura de congelación.

Dado que la transición de fase de numerosas sustancias se extiende en una amplia gama de temperaturas, esta se designa muchas veces con el nombre de intervalo de fusión.

Conversión de las unidades (K a ºC).

$t = T - 273{,}15$

t = temperatura Celsius, grado Celsius (ºC)

T = temperatura termodinámica, keivin (K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deberán servir, esencialmente, para comprobar el funcionamiento del método de vez en cuando y para comparar con los resultados obtenidos mediante otros métodos.

En la referencia (4) se enumeran determinadas sustancias de calibración.

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se determina la temperatura {o intervalo de temperatura) de transición de fase del estado sólido al liquido o viceversa. En la práctica, las temperaturas del inicio y del final del proceso de fusión/congelación se determinan al calentar/enfriar una muestra de la sustancia problema a presión atmosférica. Se describen cinco tipos de métodos: el método de tubo capilar, el método de superficie caliente, determinación de la temperatura de congelación, métodos de análisis térmico y determinación del punto de fluidez (como el método elaborado para derivados del petróleo).

En algunos casos puede ser conveniente medir la temperatura de congelación en lugar de la temperatura de fusión.

1.4.1. **Método de tubo capilar**

1.4.1.1. *Dispositivos de temperatura de fusión con baño líquido*

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

1.4.1.2. *Dispositivos de temperatura de fusión con bloque metálico*

El fundamento es el mismo que el descrito en el punto 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 este último.

1.4.1.3. *Detección fotoeléctrica*

Calentar automáticamente en un cilindro metálico la muestra contenida en el tubo capilar. Por una abertura practicada en el cilindro, enviar un rayo de luz a través de la sustancia hacia una célula fotoeléctrica cuidadosamente calibrada. En el momento de la fusión, las propiedades ópticas de la mayor parte de las sustancias se modifican en el sentido de que la opacidad da paso a la transparencia. En consecuencia, la intensidad de la luz que llega a la célula fotoeléctrica aumenta y envía una señal de parada al indicador digital que registra la temperatura del termómetro de resistencia de platino colocado en la cámara de calentamiento. Este método no es aplicable a determinadas sustancias muy coloreadas.

1.4.2. **Método de superficie caliente**

1.4.2.1. *Método de la placa caliente de Kofler*

La placa caliente de Kofler se compone de dos piezas de metal de conductividad térmica diferente, que se calientan eléctricamente. Está hecha de manera que el gradiente de temperatura sea casi lineal en toda su longitud. La temperatura de dicha placa puede variar de 283 a 573 K gracias a un dispositivo especial de lectura de la temperatura que tiene un cursor con un índice y una regleta graduada, especialmente concebido para dicha placa. Para determinar un punto de fusión se deposita una fina capa de sustancia directamente sobre la placa caliente. En unos segundos, se forma una fina línea de división entre la fase fluida y la fase sólida. Leer la temperatura a la altura de dicha línea, colocando el índice frente a esta última.

▼B

1.4.2.2. *Microscopio de fusión*

Se utilizan diferentes microscopios de platina caliente para determinar puntos de fusión con cantidades de sustancia muy pequeñas. La temperatura se suele medir con un termopar sensible, pero a veces se usa un termómetro de mercurio. El dispositivo tipo tiene una carcasa de calor que contiene una platina de metal en la que se coloca una lámina de vidrio sobre la que se deposita la muestra. El centro de la platina metálica se atraviesa con un agujero que permite el paso de la luz procedente del espejo de iluminación del microscopio. Al utilizarlo, la carcasa se cierra con una placa de vidrio para impedir la entrada de aire a la zona de la

El calentamiento de la muestra se regula con un reostato. Para realizar mediciones muy precisas se puede utilizar luz polarizada en el análisis de las sustancias ópticamente anisótropas.

1.4.2.3. *Método de menisco*

Este método se aplica específicamente a las poliamidas.

Se determina la temperatura a la cual se observa, a simple vista, el desplazamiento de un menisco de aceite de silicona, atrapado entre una superficie caliente y un cubreobjetos colocado encima de la muestra de poliamida.

1.4.3. **Método de determinación del punto de congelación**

Introducir la muestra en un tubo de ensayo especial y colocarlo en un aparato que permita la determinación del punto de congelación. Agitar suavemente la muestra sin interrupción durante el enfriamiento, observando al mismo tiempo la temperatura y registrándola a intervalos adecuados. Cuando varias lecturas indiquen una temperatura constante (previa corrección termométrica), se considera el valor de esta temperatura como el punto de congelación.

Debe evitarse el sobreenfriamiento manteniendo el equilibrio entre las fases sólida y líquida.

1.4.4. **Análisis térmico**

1.4.4.1. *Análisis térmico diferencial (ATD)*

Esta técnica registra la diferencia de temperaturas entre ¡a sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando ¡a sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Cuando la muestra sufre una transición que suponga un cambio de entalpia, ese cambio se indicará por una desviación endotérmica (fusión) o exotérmica (congelación) de la línea de base del registro de temperatura.

▼B

1.4.4.2. *Calorimetría diferencial de barrido (CDB)*

Esta técnica registra la diferencia de apone energético a una sustancia y a un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Esta energía es la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la sustancia y el material de referencia. Cuando la muestra sufre una transición que suponga un cambio de entalpia, ese cambio se indicará por una desviación endotérmica (fusión) o exotérmica (congelación) de la línea de base del registro del flujo de calor.

1.4.5. **Punto de fluidez**

Este método, desarrollado para los derivados del petróleo, es adecuado para utilizarse con sustancias oleosas de baja temperatura de fusión.

Tras un calentamiento previo, se va enfriando la muestra a una velocidad específica y se examinan sus características Teológicas a intervalos de 3 K. Se registra como punto de fluidez la temperatura mínima a la que se aprecia movimiento de la sustancia.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

En el cuadro siguiente se indican las condiciones de aplicación y la precisión de los diferentes métodos de determinación del punto de fusión/intervalo de fusión.

CUADRO: APLICABILIDAD DE LOS MÉTODOS

A. **Método de tubo capilar**

Método de medidas	Sustancias pulverizablesSí	Sustancias difícilmente pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada [1]	Norma existente
Dispositivo de temperatura de fusión con baño liquido	Sí	Solo algunas	De 273 a 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Dispositivo de temperatura de fusión con un bloque metálico	Sí	Solo algunas	De 293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Detección fotoeléctrica	Sí	Varias con dispositivos de aplicación	De 253 a 573 K	± 0,5 K	

[1] Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

▼B

B. **Métodos de superficie caliente y de congelación**

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilmente pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existente
Placa caliente Kofler	Sí	No	De 283 a > 573K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Microscopio de fusion	Sí	Solo algunas	De 273 a > 573K	± 0,5 K	DIN 53736
Método de menisco	No	Específico de las poliamidas	De 293 a > 573K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Métodos de punto de congelación	Sí	Sí	De 223 a 573 K	± 0,5 K	por ejemplo BS 4695

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

C. **Análisis térmico**

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilmente pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existence
Análisis térmico diferenctal	Sí	Sí	De 173 a 1 273 K	hasta 600K±0,5Khasta 1 273 K ± 2,0 K	ASTME 53776
Calorimetría diferencial de barrido	Sí	Sí	De 173 a 1 273 K	hasta 600K±0,5Khasta 1 273 K ± 2,0 K	ASTME 53776

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

D. **Punto de fluidez**

Método de medidas	Sustancias pulverizables	Sustancias difícilmente pulverizables	Gama de temperatura	Precisión estimada (1)	Norma existente
Punto de fluidez	Para derivados del petróleo y sustancias oleosas	Para derivados del petróleo y sustancias oleosas	Pe 223 a 323 K	± 3,0 K	ASTM D 9766

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

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

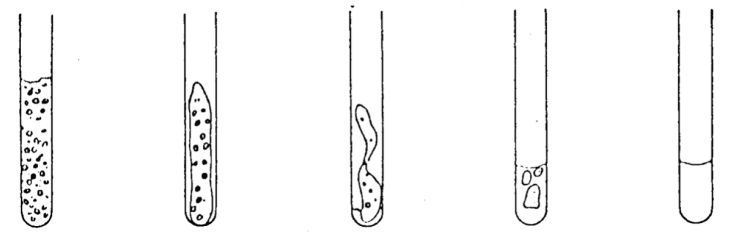
Los procedimientos de casi todos los métodos de ensayo están descritos en normas internacionales y nacionales (véase el apéndice 1).

1.6.1. **Métodos de tubo capilar**

Cuando la elevación de temperatura es lenta, las sustancias finamente pulverizadas pasarán, normalmente, por las fases de fusión representadas en la figura 1:

▼B

Figura 1



Fase A = (Comienzo de la fusión): se adhieren uniformemente gotas finas a la pared interior del tubo capilar.

Fase B = Aparece un espacio libre entre la muestra y la pared interior, en razón de la retracción del producto en fusión.

Fase C = La muestra, retraída, comienza a hundirse y a licuarse.

Fase D = Se forma un menisco completo en la superficie, pero queda todavía una cantidad apreciable de partículas sólidas.

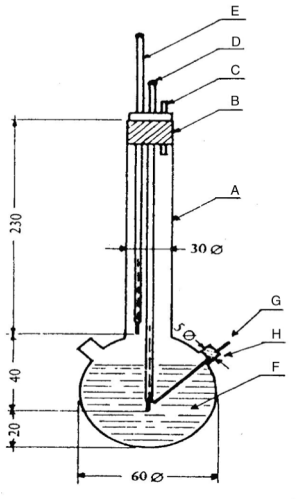
Fase E = (Final de la fusión): no hay ya ninguna partícula sólida.

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

1.6.1.1. *Dispositivos con baña líquido*

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

Figura 2



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

▼B

Baño líquido

El líquido deberá elegirse en función del punto de fusión que deba determinarse; por ejemplo, se utilizará parafina líquida para los puntos de fusión que no pasen de 473 K, aceite de silicona para los puntos de fusión que no pasen de 573 K.

Podrá utilizarse una mezcla de tres partes de ácido sulfúrico y dos partes de sulfato de potasio (en peso) para los puntos de fusión superiores a 523 K. Deben adoptarse precauciones adecuadas cuando se utilice este tipo de mezcla.

Termómetro

Solo podrán utilizarse termómetros que cumplan las exigencias de las normas siguientes o de sus equivalentes:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Procedimiento

Pulverizar finamente la sustancia seca en un mortero e introducirla en un tubo capilar cerrado en un extremo. La altura del contenido será de unos 3 mm después de haberlo comprimido bien. Para obtener una muestra uniformemente comprimida, hay que dejar caer el tubo capilar desde una altura de unos 700 mm por el interior de un tubo de vidrio colocado verticalmente sobre un vidrio de reloj.

Colocar el tubo capilar, así llenado, en el baño de tal manera que la parte central del bulbo de mercurio del termómetro esté en contacto con la parte del capilar que contiene la muestra. En general, el tubo capilar se introduce en el aparato en el momento en que el baño está a unos 10 K por debajo del punto de fusión.

Regular el calentamiento del baño de manera que el aumento de la temperatura sea de unos 3 K/minuto. Agitar el líquido. Al llegar a unos 10 K por debajo de la temperatura de fusión esperada, regular el aumento de temperatura a un máximo de 1 K/minuto.

Cálculo

El cálculo del punto de fusión se efectúa mediante la fórmula siguiente;

$$T = T_D + 0{,}00016(T_D - T_E)\ n$$

donde

T = temperatura de fusión corregida, expresada en K

T_D = temperatura leída en el termómetro D, expresada en K

T_E = temperatura leída en el termómetro E, expresada en K

n = número de graduaciones de la columna de mercurio del termómetro D en el vástago emergente.

1.6.1.2. *Dispositiva con bloque metálico*

Aparato:

El aparato consta de:

— un bloque metálico cilíndrico cuya parte superior está vacía y forma un recinto de calentamiento (véase la figura 3),

— un tapón metálico atravesado por dos o más agujeros que permitan la introducción de los tubos en el bloque,

▼B

— un sistema de calentamiento del bloque metálico; por ejemplo, una resistencia eléctrica incorporada al bloque,

— un reostato para regular la potencia, si se utiliza calentamiento eléctrico,

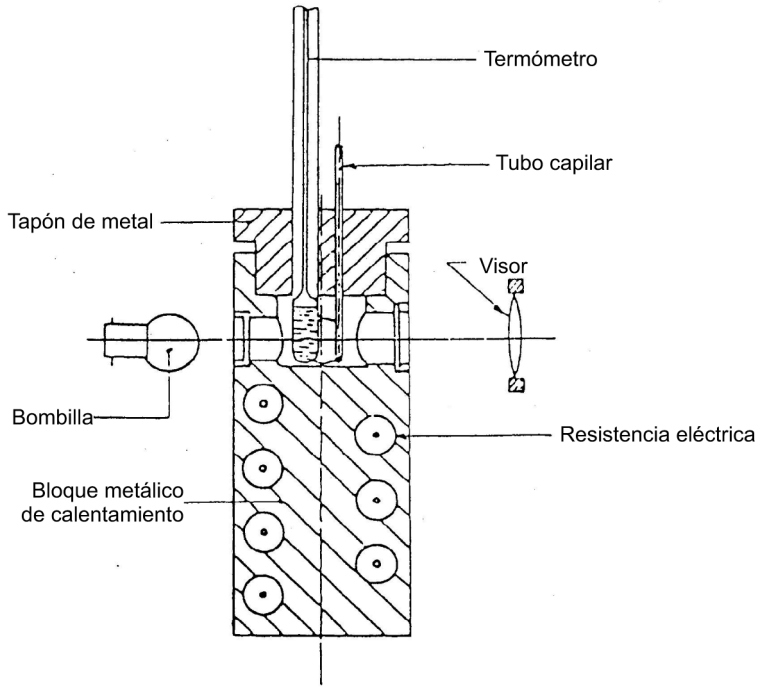
— cuatro ventanas de vidrio resistente al calor, diametralmente opuestas, en ángulo recto, en las paredes laterales del recinto. Frente a una de dichas ventanas se instalará un visor para observar el tubo capilar. Las otras tres ventanas permitirán iluminar el interior del recinto mediante bombillas,

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

Termómetro

Véanse las normas citadas en el punto 1.6.1.1. También podrán utilizarse elementos termoeléctricos de una precisión equivalente.

Figura 3



1.6.1.3. *Detección fotoeléctrica*

Aparato y procedimiento:

El aparato consiste en un recinto metálico dotado de un sistema de calentamiento automático. Se llenan tres tubos capilares siguiendo las instrucciones del punto 1.6.1.1 y se colocan en el horno.

▼B

Se pueden hacer varios aumentos lineales de temperatura para calibrar el aparato. El aumento de temperatura apropiado se regula eléctricamente con una velocidad constante y lineal preseleccionada. Los aparatos registradores indican la temperatura real del horno y la temperatura de la sustancia en los tubos capilares.

1.6.2. **Métodos de superficie caliente**

1.6.2.1. *Placa caliente Kofler*

Véase el apéndice.

1.6.2.2. *Microscopio de fusión*

Véase el apéndice.

1.6.2.3. *Método de menisco (poliamidas)*

Véase el apéndice.

El aumento de temperatura en la zona del punto de fusión deberá ser inferior a 1 K/min,

1.6.3. **Métodos de determinación del punto de congelación**

Véase el apéndice.

1.6.4. **Análisis térmico**

1.6.4.1. *Análisis térmico diferencial*

Véase el apéndice.

1.6.4.2. *Calorimetría diferencial de barrido*

Véase el apéndice.

1.6.5. **Determinación del punto de fluidez**

Véase el apéndice.

2. **RESULTADOS**

En determinados casos es necesaria la corrección del termómetro,

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— estimación de la precisión.

El punto de fusión indicado en el informe será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas en la zona de la precisión estimada (véase el cuadro).

▼B

Si la diferencia entre las temperaturas al comienzo y al final de la fusión se encuentra dentro de los límites de precisión del método, la temperatura leída en la fase final de la fusión se considerará el punto de fusión; de lo contrario, se indicarán las dos temperaturas.

Si la sustancia se descompone o se sublima antes de alcanzar el punto de fusión, se indicará la temperatura a la que se observa el efecto.

Deben indicarse todas las informaciones y observaciones que se consideren útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

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

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics., Butterworths, Londres, 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd. ed., Interscience Publ., Nueva York, 1959, Vol I, Part I, Chapter VII.

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

▼B

Apéndice

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

1. **Métodos de tubo capilar**

1.1. Dispositivos con baño líquido

ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals
BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
J1S K 00-64	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products

1.2. Dispositivos con bloque metálico

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristalimen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

2. **Métodos de superficie caliente**

2.1. Placa caliente de Kofler

ANSI/ASTM *D* 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings

2.2. Microscopio de fusión

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristaliinen Kunststoffen

2.3. Método de menisco (poliamidas)

ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Decermination of «Melting- Point»

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard Specification for Acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials
NF T 51050	Resines de polyamides. Determination du «point de fusion-. Méthode du ménisque»

3. **Métodos de determinación del punto de congelación**

BS 4633	Method for the Determination of Crystallizing Point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Besrimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftsroffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: determination de la temperature de figeage
DIN 53175	Besrimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristalisation (point de congelation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Análisis térmico**

4.1. Análisis térmico diferencial

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of, differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalyrical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Calorimetría diferencial de barrido

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating *to* thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Determinación del punto de fusión**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontieding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

▼B

A.2. PUNTO DE EBULLICIÓN

1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y (3).

1.1. INTRODUCCIÓN

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

La importancia dada a la descripción de los métodos basados en la detección fotoeléctrica y en el análisis térmico se debe al hecho de que estos métodos permiten determinar no solo el punto de fusión sino también el punto de ebullición. Además, las medidas pueden efectuarse de manera automática.

El «método dinámico» tiene la ventaja de poder utilizarse igualmente para la determinación de la presión de vapor y hacer innecesaria la corrección de la temperatura de ebullición para llevarla a las condiciones normales de presión (101,325 kPa), ya que durante la medición se puede ajustar la presión normal mediante un manostato.

Observaciones

La influencia de las impurezas en la determinación del punto de ebullición depende mucho de la naturaleza de la impureza. Si en la muestra hay impurezas volátiles, que pudieran afectar a los resultados, puede procederse a purificar la sustancia.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La temperatura de ebullición normal se define como la temperatura en que la presión de vapor de un líquido es 101,325 kPa.

Si la temperatura de ebullición no se mide a la presión atmosférica normal, la dependencia de la presión de vapor respecto a la temperatura puede calcularse cuantitativamente por la ecuación de Clausius-Clapeyron:

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

donde

p = presión de vapor de la sustancia en pascales

A H_v = su calor de vaporización en J mol^{-1}

R = constante universal de los gases = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura termodinámica, expresada en K.

La temperatura de ebullición se establece con relación a la presión ambiente en el momento de la medición.

▼B

Conversiones

Presión (unidad: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(todavía se permite la unidad «bar» pero no es recomendable).

133 Pa = 1 mm Hg

1 Torr (no se permite la unidad «Torr» ni «mm Hg»).

1 atm = atmósfera normal = 101 325 Pa

(no se permite la unidad «atm»).

Temperatura (unidad: K)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura Celsius, grado Celsius (ºC)

T: temperatura termodinámica, Kelvin (K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven esencialmente para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados según otros métodos.

En los métodos enumerados en el apéndice figuran algunas sustancias de calibración.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Cinco métodos de determinación del punto de ebullición (o del intervalo de ebullición) se basan en la medición de la temperatura de ebullición; otros dos se basan en el análisis térmico.

1.4.1. **Método del ebullómetro**

Aunque en un principio los ebullómetros se pensaron para determinar el peso molecular por elevación del punto de ebullición, se prestan también para realizar mediciones exactas del punto de ebullición. En la norma ASTM D 1120-72 (véase el apéndice), se describe un aparato muy sencillo. En dicho aparato, el líquido se calienta en condiciones de equilibrio a la presión atmosférica hasta ebullición.

1.4.2. **Método dinámico**

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

1.4.3. **Método de destilación para el punto de ebullición**

Este método se basa en la destilación del líquido, la medida de la temperatura de recondensación del vapor y la determinación de la cantidad de destilado.

▼B

1.4.4. **Método de Siwoloboff**

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

1.4.5. **Detección fotoeléctrica**

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

1.4.6. **Análisis térmico diferencial**

Esta técnica registra la diferencia de temperatura entre la sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Cuando la muestra sufre una transición que implique un cambio de entalpia, ese cambio se indica con una desviación endotérmica (ebullición) respecto a la línea base del registro de temperatura.

1.4.7. **Calorimetría diferencial de barrido**

Esta técnica registra la diferencia de aporte energético a una sustancia y a un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Esta energía es la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la sustancia y el material de referencia. Cuando la muestra sufre una transición que implique un cambio de entalpia, ese cambio se indica con una desviación endotérmica (ebullición) respecto a la línea base del registro de flujo de calor.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

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

Cuadro 1

Comparación de los métodos

Método de medición	Precisión estimada	Norma existente
Ebullómerro	± 1,4 K (hasta 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (hasta 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Método dinámico	± 0,5 k (hasta 600 K) (2)	
Método de destilación (intervalo de ebullición)	± 0,5 k (hasta 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Método de Siwoloboff	± 2 K (hasta 600 K) (2)	
Detección fotoeléctrica	± 0,3 K (a 373 K) (2)	
Calorimetría térmica diferencial	± 0,5 K (hasta 600 K) ± 2,0 K (hasta 1 273 K)	ASTM E 537-76
Calorimetría diferencial de barrido	± 0,5 K (hasta 600 K) ± 2,0 K (hasta 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Esta precisión solo es válida para aparatos sencillos, como el descrito en la norma ASTM D 1120-72; es posible mejorarla utilizando ebullómetros más perfeccionados.
(2) Válido solamente para sustancias puras. El uso en otras circunstancias debe justificarse.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

En las normas internacionales y nacionales (véase el apéndice) se describen los procedimientos de algunos métodos de ensayo.

1.6.1. **Ebullómetro**

Véase el apéndice.

1.6.2. **Método dinámico**

Véase el método de ensayo A.4 para la determinación de la presión de vapor.

Se considera como temperatura de ebullición la registrada a una presión de 101,325 kPa,

1.6.3. **Método de destilación (intervalo de ebullición)**

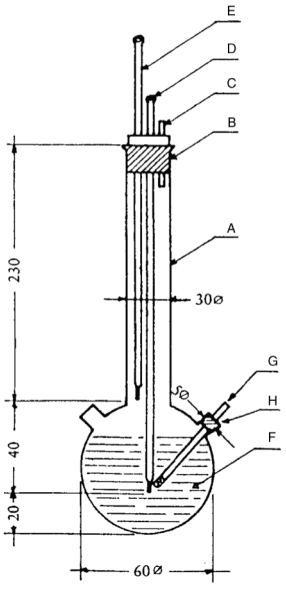
Véase el Apéndice,

1.6.4. **Método de Siwoloboff**

Se introduce la muestra en un tubo de muestra de unos 5 mm de diámetro y se calienta en un aparato apropiado para determinar el punto de fusión (véase la figura 1).

En la figura 1 hay un ejemplo de aparato normalizado apropiado para determinar el punto de fusión y el punto de ebullición (JIS K 0064). Las dimensiones están expresadas en milímetros. El aparato es de vidrio.

Figura 1



A = Matraz de medida
B = Tapón
C = Tubo de ventilación
D = Termómetro
E = Termómetro auxiliar
F = Baño líquido
G = Tubo de muestra (5 mm de diámetro exterior como máximo) con un tubo capilar de unos 100 mm de longitud, alrededor de 1 mm de diámetro interior, y alrededor de 0,2 o 0,3 mm de espesor de la pared
H = Tubo lateral

En el tubo de muestra que contiene la sustancia se introduce un tubo capilar (capilar de ebullición), cerrado a aproximadamente 1 cm de su extremo inferior. El nivel hasta el que se añade la sustancia problema es tal que la parte cerrada del capilar quede situada por debajo de la superficie del líquido. El tubo de muestra con el capilar de ebullición debe estar unido al termómetro mediante una cinta elástica o un soporte lateral (véase la figura 2).

▼B

Figura 2

Método de Siwoloboff

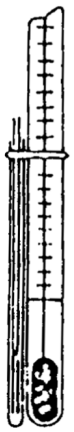
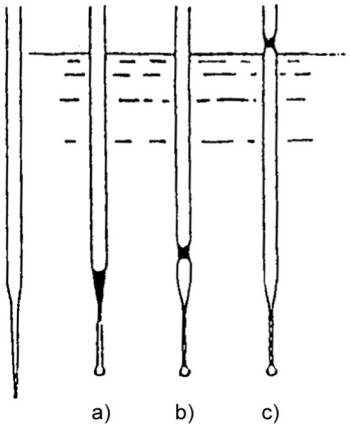


Figura 3

Método modificado



El líquido del baño se elige en función de la temperatura de ebullición. Se puede utilizar aceite de silicona para temperaturas de hasta 573 K. La parafina liquida solo puede usarse para temperaturas inferiores a 473 K. Al principio, el calentamiento del baño debe graduarse de manera que se obtenga un aumento de temperatura de 3 K por minuto. Hay que agitar el líquido del baño. A unos 10 K por debajo del punto de ebullición supuesto, se reduce el calentamiento de tal manera que el aumento de la temperatura no llegue a 1 K/minuto. Al acercarse a la temperatura de ebullición, comienzan a salir rápidamente burbujas del capilar de ebullición.

El punto de ebullición se define como la temperatura a la cual, en un enfriamiento momentáneo, se interrumpe el rosario de burbujas y el líquido comienza a elevarse súbitamente por el capilar. La temperatura leída en el termómetro en ese preciso momento corresponde a la temperatura de ebullición de la sustancia de ensayo.

En el método modificado (véase la figura 3), el punto de ebullición se determina en un capilar de punto de fusión. Este último se alarga en una punta fina de unos 2 cm de longitud (a) y se aspira hacia el interior una pequeña cantidad de sustancia. El extremo abierto del fino capilar se cierra por fusión, de forma que quede una pequeña burbuja de aire en el extremo. Al calentarla en el aparato de punto de fusión (b), la burbuja de aire se va dilatando. El punto de ebullición corresponde a la temperatura a la que el tapón de muestra llega al nivel de la superficie del baño de líquido (c).

1.6.5. **Detección fotoeléctrica**

Se calienta una muestra de la sustancia en un tubo capilar colocado dentro de un bloque metálico de calentamiento.

Por las aberturas practicadas en el bloque, se envía un haz de luz a través de la sustancia hacia una célula fotoeléctrica calibrada en forma precisa.

Durante el aumento de la temperatura de la muestra, van escapando del capilar de ebullición algunas burbujas aisladas de aire. Cuando se alcanza la temperatura de ebullición, el número de burbujas aumenta mucho. La consiguiente modificación de la intensidad luminosa es registrada por la célula, que envía una señal de interrupción al indicador que da la temperatura de un termómetro de resistencia de platino colocado en el bloque.

Este método es especialmente útil, pues permite efectuar determinaciones por debajo de la temperatura ambiente hasta 253,15 K (-20 ºC) sin ninguna modificación del aparato. Basta con colocar este en un baño refrigerante

▼B

1.6.6. **Análisis térmico**

1.6.6.1. *Análisis térmico diferencial*

Véase el apéndice.

1.6.6.2. *Calorimetría diferencial de barrido*

Véase el apéndice.

2. **RESULTADOS**

Cuando haya diferencias pequeñas respecto a la presión normal (máxima de ± 5 kPa), las temperaturas del punto de ebullición podrán normalizarse a T_n mediante la ecuación de valor numérico de Sidney Young:

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

donde

A p = (101,325 — p) [atención al signo]

p = medida de la presión, en kPa

f_T = tasa de variación del punto de ebullición con la presión, en K/kPa

T = valor medido de la temperatura de ebullición, en K

T_n = valor de la temperatura de ebullición corregido a presión normal, en K.

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

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

Cuadro 2

Factores de corrección de la temperatura (f_t)

Temperatura T en K	Factor de corrección f_T en K/kPa
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

▼B

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— estimación de la precisión.

El punto de ebullición registrado será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas en la zona de precisión estimada (véase el cuadro 1).

Deberán indicarse los valores medidos de los puntos de ebullición así como su media, y la presión o presiones a que se hayan efectuado las mediciones deberán registrarse en kPa. La presión debe, preferentemente, ser próxima a la presión atmosférica normal.

Deben suministrarse todas las informaciones y observaciones que se consideren útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C (81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, Londres 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., Nueva York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Apéndice

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

1. **Ebullómetro**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Método de destilacion (intervalo de ebullicion)**

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	Losungsmittel fur Anstrichstoffe. Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation; determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Analisis termico diferencial y calorimetria diferencial de barrido**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

A.3. DENSIDAD RELATTVA

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en la referencia (2).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos descritos de determinación de la densidad relativa son aplicables a las sustancias sólidas y líquidas, cualquiera que sea su grado de pureza. En el cuadro 1 se indican los diversos métodos utilizables.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La densidad relativa, D^{20}_4, de los sólidos o líquidos es la relación entre la masa de un volumen de sustancia problema, determinada a 20 ºC, y la masa del mismo volumen de agua, determinada a 4 ºC. 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, p, se expresa en kilogramos por metro cúbico.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA (1) (3)

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deben utilizarse, esencialmente, para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos,

1.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS

Se aplican cuatro clases de métodos.

1.4.1. **Métodos de flotabilidad**

1.4.1.1. *Areómetro* (para líquidos)

Se pueden obtener determinaciones de densidad suficientemente precisas y rápidas con areómetros flotantes, que permiten deducir la densidad de un líquido a partir de la profundidad de inmersión leída en una escala graduada.

1.4.1.2. *Balanza hidrostática* (para sustancias líquidas y sólidas)

La diferencia entre el peso de una muestra medido en el aire y en un líquido adecuado (como el agua) puede servir para determinar su densidad.

En el caso de los sólidos, la densidad medida solo es representativa de la muestra utilizada en concreto. Para determinar la densidad de un líquido, se pesa un cuerpo, con un volumen v conocido, primero en el aire y luego en el líquido.

1.4.1.3. *Método del cuerpo sumergido* (para las sustancias líquidas) (4)

En este método, la densidad de un líquido se determina a partir de la diferencia entre los resultados de la pesada del líquido, antes y después de sumergir un cuerpo de volumen conocido en dicho líquido problema.

▼B

1.4.2. **Métodos picnométricos**

Para sólidos o líquidos, se pueden utilizar picnómetros de diversas formas cuyos volúmenes sean conocidos. La densidad se calculará a partir de la diferencia de peso entre el picnómetro lleno y el picnómetro vacío, por una parte, y de su volumen conocido, por la otra.

1.4.3. **Picnómetro de comparación de aire** (para sólidos)

La densidad de un sólido, cualquiera que sea su forma, se puede medir a la temperatura ambiente mediante un picnómetro de comparación de gases. El volumen de una sustancia en el aire o en un gas inerte se mide en una probeta calibrada de volumen variable. Para el cálculo de la densidad, se efectúa una medida de la masa después de la medida del volumen.

1.4.4. **Densímetro oscilante** (5) (6) (7)

La densidad de un líquido se puede medir con un densímetro oscilante. Un oscilador mecánico con forma de tubo en U se hace vibrar a la frecuencia de resonancia del oscilador, que depende de su masa. La introducción de una muestra modifica la frecuencia de resonancia del oscilador, el cual debe calibrarse con ayuda de dos sustancias líquidas de densidades conocidas. Las sustancias deben elegirse de tal manera que sus densidades cubran el intervalo de medición.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

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

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Las referencias de las normas citadas como ejemplo, las cuales pueden consultarse para obtener detalles técnicos suplementarios, figuran en el apéndice.

Los ensayos deberán realizarse a la temperatura de 20 ºC y deben hacerse, al menos, dos medidas.

2. **RESULTADOS**

Véanse las normas.

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa.

También se indicarán tanto la densidad relativa, D_4^{20}, según lo definido en el punto 1.2, como el estado físico de la sustancia examinada,

Deben suministrarse todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

▼B

Cuadro

Aplicabilidad de los métodos

Método de medida	Densidad		Viscosidad dinámica máxima posible	Normas existentes
	sólido	líquido		
1.4.1.1. Areómetro		Sí	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Balanza hidrostática				
a) sólidos	Sí			ISO 1183 (A)
b) líquidos		Sí	5 Pa S	ISO 901 y 758
1.4.1.3. Método del cuerpo sumergido		Sí	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Picnómetro				ISO 3507
a) sólidos	Sí			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) líquidos		Sí	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Picnómetro de comparación de aire	Sí			DIN 55990 parte 3, DIN 53243
1.4.4. Densímetro oscilante		Si	5 Pa s	

4. **BIBLIOGRAFÍA**

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

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ. Nueva York, 1959, Vol. I, Part 1,

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realizatíon of physico-chemical properties. — Pure and Applied Chemistry, 1976, Vol. 48, 508.

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

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

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestim-mung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeurische Industrie, 1975, Vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Braureilaboratorium, Brauwissenscbaft, 1976, Vol. 9, 253-255.

▼B

Apéndice

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

1. **Métodos de flotabilidad**

1.1. Areómetro

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer: general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydxometers; standardised sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Balanza hidrostática

Para sustancias sólidas

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Para sustancias líquidas

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density.

ASTM D 941-55, ASTM D 12 96-67 y ASTM D 1481-62

ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Métodos del cuerpo sumergido

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Métodos picnométricos**

2.1. Para sustancias líquidas

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 ºC
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pyenometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100,10^{-6}$ m^{2-l} at 15 ºC)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100, 10—^{6} m^{2} s^{-1} at 20 ºC, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 ºC)

▼B

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 1: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products — chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use— Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method

▼B

2.2. Para sustancias sólidas

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Picnómetro de comparación de aire**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. PRESIÓN DE VAPOR

1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 104 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

La presente versión revisada del método A.4 (1) añade un método más (método de efusión: termogravimetría isotérmica) pensado para sustancias con presiones muy bajas (hasta un límite inferior de 10^{-10} Pa). Teniendo presentes las necesidades en lo que se refiere a procedimientos, especialmente en relación con la obtención de la presión de vapor de sustancias en la que esta es baja, se reexamina asimismo la aplicabilidad en intervalos distintos de otros procedimientos de este método.

En situación de equilibrio termodinámico, la presión de vapor de una sustancia pura depende exclusivamente de la temperatura. Los principios fundamentales se describen en otro lugar (2) y (3).

No existe ningún procedimiento de medida que sea aplicable a toda la gama de presiones de vapor, desde menos de 10^{-10} hasta 10^5 Pa. Se incluyen en el presente método ocho procedimientos de medición de la presión de vapor aplicables a distintos intervalos de presión de vapor. En el cuadro 1 se comparan todos ellos en lo que se refiere a aplicación e intervalo de medida. Los métodos solo pueden aplicarse a compuestos que no se descompongan en las condiciones del ensayo. Cuando, por motivos técnicos, no puedan aplicarse los métodos experimentales, se puede recurrir a una estimación de la presión de vapor. En el apéndice figura un método de estimación recomendado.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La presión de vapor de una sustancia se define como la presión de saturación de la misma en equilibrio con su fase líquida o sólida.

Debe utilizarse la unidad de presión del SI, que es el pascal (Pa). A continuación se citan otras unidades que se han empleado históricamente, indicando sus factores de conversión:

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

1 atmósfera = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

La unidad de temperatura en el SI es el Kelvin (K). La conversión de grados Celsius a Kelvin se realiza mediante la fórmula:

$$T = t + 273{,}15$$

donde T es la temperatura termodinámica o Kelvin y t es la temperatura Celsius.

▼**M1**

Cuadro 1

Método de medida	Sustancias		Repetibilidad estimada	Reproducibilidad estimada	Intervalo recomendado
	sólidas	líquidas			
Método dinámico	bajo punto de fusión	Sí	hasta el 25 % del 1 al 5 %	hasta el 25 % del 1 al 5 %	10^3 a 2×10^3 Pa 2×10^3 a 10^5 Pa
Método estático	Sí	Sí	del 5 al 10 %	del 5 al 10 %	10 a 10^5 Pa 10^{-2} a 10^5 Pa (1)
Método del isoteniscopio	Sí	Sí	del 5 al 10 %	del 5 al 10 %	10^2 a 10^5 Pa
Método de efusión: balanza de presión de vapor	Sí	Sí	del 5 al 20 %	hasta el 50 %	10^{-3} a 1 Pa
Método de efusión: celda de Knudsen	Sí	Sí	del 10 al 30 %	—	10^{-10} a 1 P
Método de efusión: termogravimetría isotérmica	Sí	Sí	del 5 al 30 %	hasta el 50 %	10^{-10} a 1 Pa
Método de saturación de gases	Sí	Sí	del 10 al 30 %	hasta el 50 %	10^{-10} a 10^3 Pa
Método del rotor	Sí	Sí	del 10 al 20 %	—	10^{-4} a 0,5 Pa

(1) Cuando se usa un manómetro de capacitancia.

1.3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Por regla general, se determina la presión de vapor a distintas temperaturas. En un intervalo de temperaturas limitado, el logaritmo de la presión de vapor de una sustancia pura es función lineal de la inversa de la temperatura termodinámica, con arreglo a la ecuación de Clapeyron-Clausius simplificada:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2,3RT} + constante$$

donde:

p = presión de vapor en pascales

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

R = constante universal de los gases, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura en K.

▼**M1**

1.4. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es preciso utilizar sustancias de referencia. Sirven fundamentalmente para comprobar de vez en cuando el comportamiento de un método y para poder comparar los resultados obtenidos según distintos métodos.

1.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

1.5.1. **Método dinámico (método de Cottrell)**

1.5.1.1. *Principio*

La presión de vapor se determina midiendo el punto de ebullición de la sustancia a diversas presiones especificadas comprendidas entre 10^3 y 10^5 Pa aproximadamente. Este método se recomienda también para la determinación de la temperatura de ebullición. Para tal fin es útil hasta 600 K. Las temperaturas de ebullición de los líquidos a una profundidad de 3 o 4 cm son superiores a las de la superficie en aproximadamente 0,1 °C, a causa de la presión hidrostática de la columna de líquido. En el método de Cottrell (4), el termómetro se coloca en el vapor por encima de la superficie del líquido y se obliga al líquido en ebullición a bombearse continuamente sobre el bulbo del termómetro. Una fina capa de líquido que está en equilibrio con el vapor a presión atmosférica cubre el bulbo. De este modo, la lectura del termómetro indica el verdadero punto de ebullición, sin errores debidos al supercalentamiento o a la presión hidrostática. En la figura 1 se muestra la bomba empleada originalmente por Cottrell. El tubo A contiene el líquido en ebullición. Un hilo de platino B fijado en el fondo contribuye a que la ebullición sea uniforme. El tubo lateral C desemboca en un condensador, y el revestimiento D impide al condensado frío llegar al termómetro E. Cuando el líquido en A hierve, las burbujas y el líquido atrapados por el embudo se vierten a través de los dos brazos de la bomba F sobre el bulbo del termómetro.

Figura 1

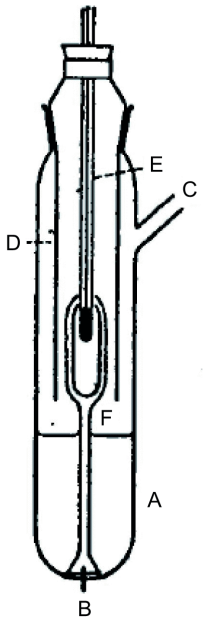
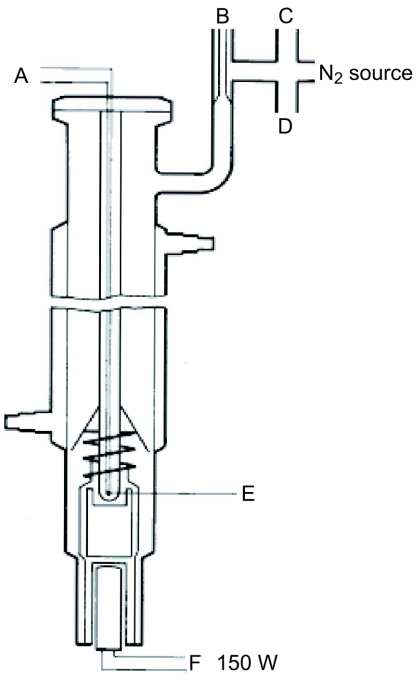


Figura 2



▼**M1**

Bomba de Cottrell (4)

A: Termopar

B: Volumen tampón de vacío

C: Indicador de presión

D: Vacío

E: Punto de medida

F: Elemento calefactor de unos 150 W

1.5.1.2. *Aparato*

La figura 2 muestra un aparato muy exacto que aplica el principio de Cottrell. Consta de un tubo con una sección de ebullición en la parte inferior, un refrigerante en la media y una salida y una pestaña en la superior. La bomba de Cottrell se coloca en la sección de ebullición, que se calienta por medio de un cartucho eléctrico. La temperatura la mide un termopar de camisa o un termómetro de resistencia introducido a través de la pestaña de la parte superior. La salida se conecta al sistema de regulación de la presión, integrado por una bomba de vacío, un volumen tampón, un manostato para admitir nitrógeno con fines de regulación de la presión y un manómetro.

1.5.1.3. *Procedimiento*

Se coloca la sustancia en la sección de ebullición. Los sólidos no pulverulentos pueden presentar problemas, que a veces se resuelven calentando la camisa de refrigeración. Se cierra el aparato con la pestaña y se extrae el gas de la sustancia. Este método no es aplicable a las sustancias que formen espuma.

Se regula a la presión más baja prevista y se acciona el sistema de calentamiento, conectando, simultáneamente, el termosensor a un registrador.

Cuando éste indique una temperatura de ebullición fija, a presión constante, se habrá alcanzado el equilibrio. Hay que evitar las sacudidas durante la ebullición. Además, debe obtenerse condensación completa en el refrigerante. Cuando se determina la presión de vapor de sólidos de bajo punto de fusión, hay que evitar que se bloquee el condensador.

Una vez registrado el punto de equilibrio, se regulará a una presión más elevada y se irá repitiendo de nuevo el mismo proceso hasta que se alcance una presión de 10^5 Pa (en total, de 5 a 10 medidas). Los puntos de equilibrio deben repetirse a presiones decrecientes para comprobar los resultados.

1.5.2. **Método estático**

1.5.2.1. *Principio*

En el método estático (5), se determina la presión de vapor en equilibrio termodinámico a una temperatura especificada. Este método resulta adecuado para sustancias y líquidos y sólidos multicomponente en el intervalo comprendido entre 10^{-1} y 10^5 Pa y, si se pone el debido cuidado, también en el comprendido entre 1 y 10 Pa.

▼**M1**

1.5.2.2. *Aparato*

El aparato consta de un baño de temperatura constante (precisión de ± 0,2 K), un recipiente para la muestra conectado a un sistema de vacío, un manómetro y un sistema de regulación de la presión. El compartimento que contiene la muestra (figura 3a) está conectado al sistema de vacío mediante una válvula y un manómetro diferencial (un tubo en forma de U lleno de un líquido manométrico apropiado) que se utiliza como indicador de cero. En el manómetro diferencial cabe utilizar mercurio, siliconas o ftalatos, según el intervalo de presiones y el comportamiento químico de la sustancia problema. Sin embargo, por motivos medioambientales, debe evitarse el uso de mercurio si es posible. La sustancia problema no debe disolverse de forma apreciable ni reaccionar con el líquido del tubo en U. En lugar del tubo en U puede utilizarse un indicador de presión (figura 3b). En el manómetro, el mercurio puede utilizarse en el intervalo desde la presión atmosférica hasta 10^2 Pa y los aceites de silicona y los ftalatos de 10^2 Pa a 10 Pa. Existen otros tipos de manómetros que pueden utilizarse por debajo de 10^2 Pa, y los manómetros de capacidad de membrana calentable pueden utilizarse incluso a presiones inferiores a 10^{-1} Pa. La temperatura se mide en la pared exterior del compartimento de la muestra o en el interior del propio compartimento.

1.5.2.3. *Procedimiento*

Utilizando el equipo descrito en la figura 3a, se llena el tubo en U con el líquido previsto, que antes de realizar las lecturas habrá sido desgasificado a temperatura elevada. A continuación se introduce en el equipo la sustancia problema y se desgasifica a temperatura reducida. Si se trata de una muestra multicomponente, la temperatura debe ser lo suficientemente baja para garantizar que la composición del material no se altere. El equilibrio puede alcanzarse más rápidamente agitando. La muestra puede enfriarse con nitrógeno líquido o hielo seco, pero hay que tener precaución para evitar la condensación de aire o del líquido de la bomba. Se abre la llave que hay sobre el recipiente de la muestra y se aplica una succión durante varios minutos para extraer el aire. Si resulta necesario, se repite varias veces la operación de desgasificado.

Figura 3a

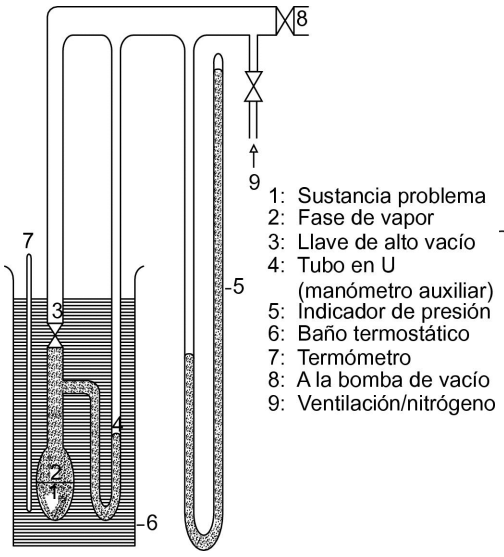
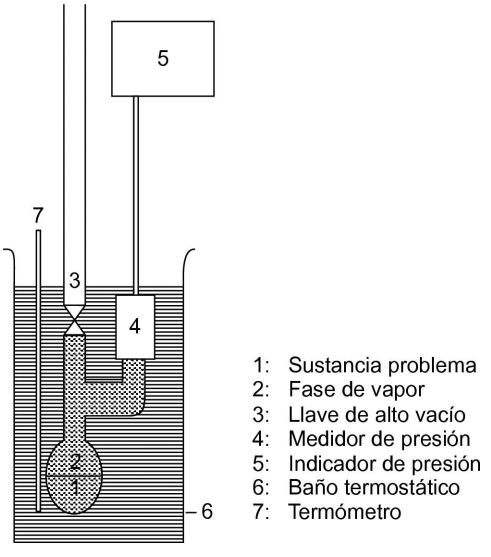


Figura 3b



▼**M1**

Al calentar la muestra con la válvula cerrada aumenta la presión de vapor, lo que hace cambiar el equilibrio del líquido del tubo en U. Para compensar este fenómeno, hay que permitir la entrada de nitrógeno o aire en el aparato hasta que el indicador de presión diferencial del manómetro esté otra vez a cero. La presión necesaria para conseguir este efecto puede leerse en el manómetro o en un instrumento de precisión superior, y corresponde a la presión de vapor de la sustancia a esa temperatura concreta de medida. Si se utiliza el equipo descrito en la figura 3b, la lectura de la presión de vapor se efectúa directamente.

La presión de vapor se determina a pequeños intervalos de temperatura adecuados (aproximadamente, entre 5 y 10 puntos de medida en total) hasta llegar a la temperatura máxima prevista.

Las lecturas a baja temperatura deben repetirse como comprobación. Si los valores obtenidos en las lecturas repetidas no coinciden con la curva obtenida al ir aumentando la temperatura, puede deberse a alguna de las situaciones siguientes:

i) la muestra sigue conteniendo aire (por ejemplo, en el caso de materiales de elevada viscosidad) o sustancias de bajo punto de ebullición, que se liberan durante el calentamiento,

ii) la sustancia sufre una reacción química en el intervalo de temperaturas investigado (por ejemplo, descomposición o polimerización).

1.5.3. **Método del isoteniscopio**

1.5.3.1. *Principio*

El isoteniscopio (6) se basa en el principio del método estático. Se trata de colocar una muestra en un bulbo mantenido a temperatura constante y conectado a un manómetro y a una bomba de vacío. Las impurezas más volátiles que la sustancia se eliminan desgasificando a temperatura reducida. La presión de vapor de la muestra a la temperatura seleccionada se equilibra mediante una presión de gas inerte conocida. El isoteniscopio se creó para medir la presión de vapor de determinados hidrocarburos líquidos, pero se presta igualmente a la investigación de sólidos. Este método no suele adecuarse a los sistemas multicomponente. Los resultados exhiben solamente errores leves en el caso de muestras que contengan impurezas no volátiles. El intervalo recomendado es de 10^2 a 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Aparato*

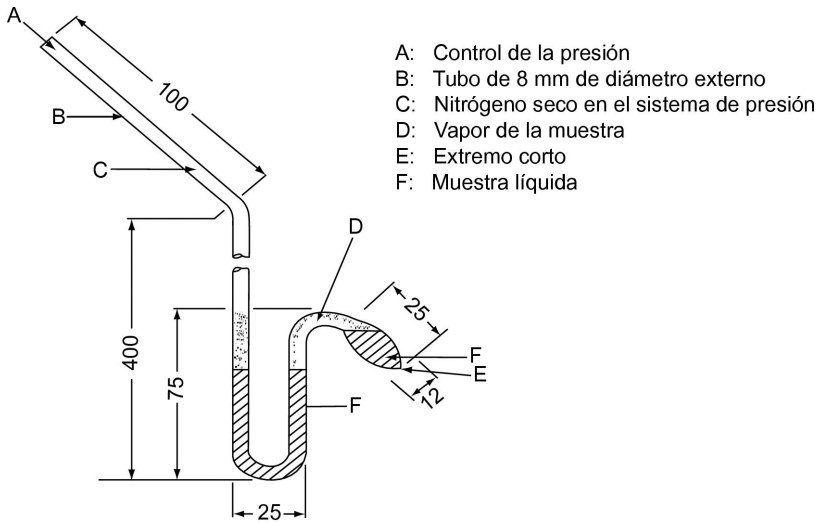
En la figura 4 se muestra un ejemplo de dispositivo de medida. En ASTM D 2879-86 (6) se encontrará una descripción completa.

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedimiento*

En el caso de los líquidos, la sustancia misma sirve de líquido de llenado para el manómetro diferencial. Se pone en el isoteniscopio una cantidad de líquido suficiente para llenar el bulbo y el extremo corto del manómetro. El isoteniscopio se une entonces a un sistema de vacío y, después de hacer el vacío en su interior, se llena de nitrógeno. La evacuación y la purga del sistema se repiten dos veces para eliminar el oxígeno residual. El isoteniscopio lleno se coloca en posición horizontal para que la muestra se extienda formando una fina capa en el bulbo de la muestra y en el manómetro. Se reduce a 133 Pa la presión del sistema y se calienta suavemente la muestra hasta que inicie la ebullición (eliminación de gases disueltos). El isoteniscopio se cambia entonces de posición para que la muestra vuelva al bulbo y llene el brazo corto del manómetro. La presión se mantiene a 133 Pa. El extremo alargado del bulbo de la muestra se calienta con una pequeña llama hasta que el vapor originado por la muestra se expande suficientemente para desplazar parte de la muestra desde la porción superior del bulbo y del brazo del manómetro hacia el manómetro, creando así un espacio libre de nitrógeno y lleno de vapor. El isoteniscopio se coloca entonces en un baño termostático y se ajusta la presión del nitrógeno hasta que iguala a la de la muestra. En equilibrio, la presión del nitrógeno es igual a la presión de vapor de la sustancia.

Figura 4



(Dimensiones en mm)

En el caso de los sólidos, se utilizarán líquidos manométricos tales como los aceites de silicona o los ftalatos, según el intervalo de temperatura y presión. El líquido manométrico desgasificado se introduce en un engrosamiento del brazo largo del isoteniscopio. A continuación se introduce en el bulbo de la muestra el sólido problema y se desgasifica a temperatura elevada. Después se inclina el isoteniscopio de forma que el líquido manométrico se introduzca en el tubo en U.

▼M1

1.5.4. **Método de efusión: balanza de presión de vapor** (7)

1.5.4.1. *Principio*

Se calienta una muestra de la sustancia problema en un horno pequeño y se introduce en una campana en la que se ha hecho el vacío. El horno está cubierto por una tapa que lleva pequeños orificios de diámetros conocidos. El vapor de la sustancia que escapa por uno de los orificios se conduce al platillo de una balanza de alta sensibilidad que también está encerrada en la campana al vacío. En algunos montajes, el platillo está rodeado por un recinto de refrigeración, que permite que el calor se disipe al exterior por conducción térmica, y enfriado por radiación de manera que el vapor que se escapa se condense sobre él. El impulso del chorro de vapor actúa sobre la balanza como una fuerza. La presión de vapor se puede obtener de dos maneras: directamente a partir de la fuerza ejercida sobre el platillo y también a partir de la velocidad de evaporación utilizando la ecuación de Hertz-Knudsen (2):

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

donde:

G = velocidad de evaporación (kg s^{-1} m^{-2})

M = masa molar (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = constante universal de los gases (J mol^{-1} K^{-1})

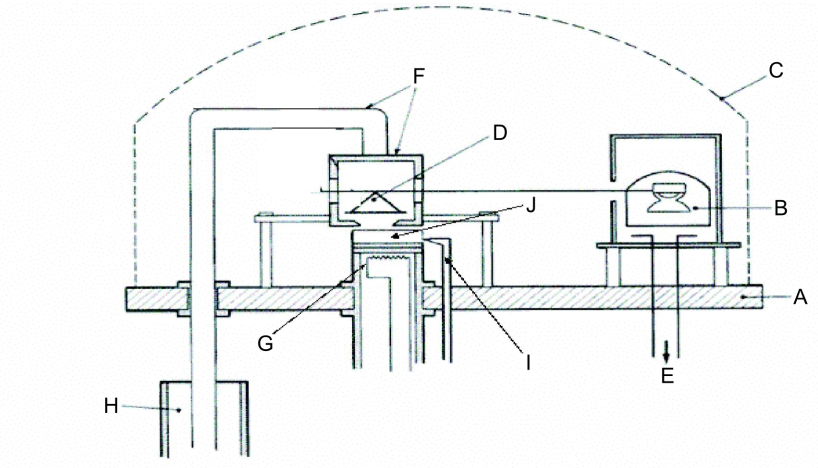
p = presión de vapor (Pa)

El intervalo recomendado es de 10^{-3} a 1 Pa.

1.5.4.2. *Aparato*

El principio general del aparato se ilustra en la figura 5.

Figura 5



A: Base

B: Instrumento de bobina móvil

C: Campana

D: Balanza con platillo

E: Dispositivo de medida de vacío

F: Recinto y barra de refrigeración

G: Horno de evaporación

H: Termo con nitrógeno líquido

I: Medida de la temperatura de la muestra

J: Sustancia problema

▼**M1**

1.5.5. **Método de efusión: celda de Knudsen**

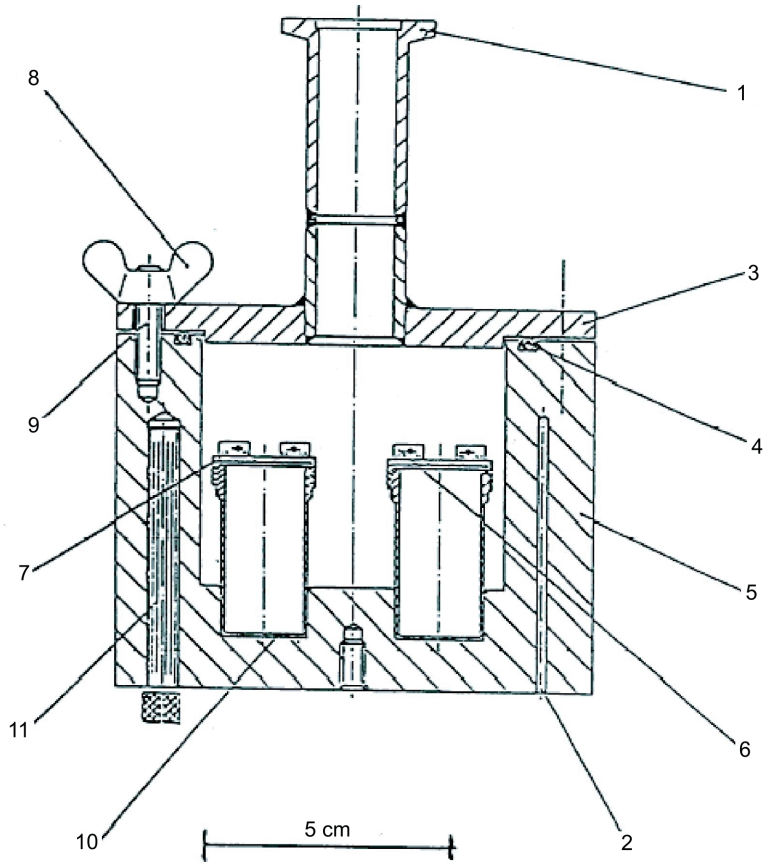
1.5.5.1. *Principio*

El método se basa en la estimación de la masa de la sustancia problema que abandona la celda de Knudsen (8) por unidad de tiempo en forma de vapor a través de un microorificio en condiciones de ultravacío. La masa del vapor objeto de efusión puede obtenerse bien determinando la pérdida de masa de la celda, bien condensando el vapor a baja temperatura y determinando mediante cromatografía la cantidad de sustancia que se ha volatilizado. La presión de vapor se calcula aplicando la relación de Hertz-Knudsen (véase el punto 1.5.4.1) con factores de corrección que dependen de los parámetros del equipo (9). El intervalo recomendado es de 10^{-10} a 1 Pa (10) (11) (12) (13) (14).

1.5.5.2. *Aparato*

El principio general del aparato se ilustra en la figura 6.

Figura 6



1: Conexión al vacío

2: Espacios para el termómetro de resistencia de platino o medida y control de la temperatura

3: Tapa del recinto de vacío

4: Toro

5: Recinto de aluminio para hacer el vacío

6: Dispositivo para instalar y quitar las células de efusión

7: Tapa de rosca

8: Tuercas de mariposa

9: Pernos

10: Células de efusión acero inoxidable

11: Cartucho calefactor

▼M1

1.5.6. **Método de efusión: termogravimetría isotérmica**

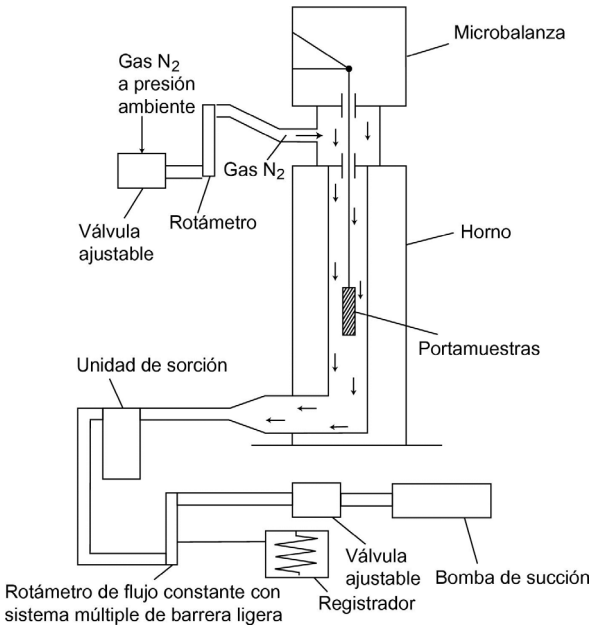
1.5.6.1. *Principio*

El método se basa en la determinación de las velocidades de evaporación aceleradas de la sustancia problema a presión ambiente y temperaturas elevadas usando la termogravimetría (10) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Las velocidades de evaporación v_T resultan de exponer el compuesto seleccionado a una atmósfera de gas inerte que fluye lentamente y controlar el peso perdido a temperaturas isotérmicas T en Kelvin definidas a lo largo de períodos de tiempo adecuados. Las presiones de vapor p_T se calculan a partir de los valores v_T utilizando la relación lineal entre el logaritmo de la presión de vapor y el logaritmo de la velocidad de evaporación. Si resulta necesario, puede hacerse una extrapolación a las temperaturas de 20 y 25 °C mediante análisis de regresión de log p_T frente a 1/T. Este método es adecuado para sustancias cuyas presiones de vapor son muy bajas, del orden de 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) y cuya pureza se acerca lo más posible al 100 % para evitar errores en la interpretación de las pérdidas de peso medidas.

1.5.6.2. *Aparato*

En la figura 7 se ilustra el principio general del montaje del experimento.

Figura 7



El portamuestras, colgado de una microbalanza en un recinto de temperatura controlada, es sometido a una corriente de gas nitrógeno seco que se lleva las moléculas vaporizadas de la sustancia problema. Tras abandonar el recinto, la corriente de gas es purificada por una unidad de sorción.

1.5.6.3. *Procedimiento*

Se aplica la sustancia problema formando una capa homogénea sobre la superficie de una placa de vidrio rugosa. Si se trata de un sólido, se humedece uniformemente la placa con una solución de la sustancia en un disolvente adecuado y se seca en una atmósfera inerte. Para la toma de medidas, la placa recubierta se cuelga en el analizador termogravimétrico y a continuación se mide continuamente la pérdida de peso en función del tiempo.

▼M1

La velocidad de evaporación v_T a una temperatura dada se calcula a partir de la pérdida de peso Δm del portamuestras mediante la fórmula

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}\left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}}\right)$$

donde F es la superficie revestida de sustancia problema, que normalmente será la superficie del portamuestras, y t es el tiempo correspondiente a una pérdida de peso Δm.

La presión de vapor p_T se calcula en función de la velocidad de evaporación v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D \cdot \log v_T$$

donde C y D son constantes específicas del montaje experimental utilizado que dependen del diámetro del recinto de medida y del caudal del gas. Estas constantes deben determinarse de antemano midiendo un conjunto de compuestos cuya presión de vapor sea conocida y calculando la recta de regresión de log p_T frente a log v_T (11) (21) (22).

La relación entre la presión de vapor p_T y la temperatura T en Kelvin viene dada por

$$\mathrm{Log}\ p_T = A + B \cdot 1/T$$

donde A y B son constantes obtenidas calculando la recta de regresión de log p_T frente a 1/T. Esta ecuación permite calcular por extrapolación la presión de vapor para cualquier otra temperatura.

1.5.7. **Método de saturación de gases (23)**

1.5.7.1. *Principio*

Se hace pasar un gas inerte, a temperatura ambiente y con un caudal conocido, a través o por encima de una muestra de sustancia problema, con lentitud suficiente para garantizar la saturación, ya que es esencial conseguir la saturación en la fase gaseosa. Se recoge la sustancia transportada, por regla general utilizando un sorbente, y se determina su cuantía. Como alternativa a la recogida de vapor y su análisis posterior, pueden utilizarse técnicas analíticas incorporadas en serie, como la cromatografía de gases, para determinar la cantidad de material transportada. La presión de vapor se calcula suponiendo que es aplicable la ley de los gases perfectos y que la presión total de una combinación de gases es igual a la suma de las presiones de los gases que la componen. La presión parcial de la sustancia problema, es decir, la presión de vapor, se calcula a partir del volumen total de gas conocido y del peso del material transportado.

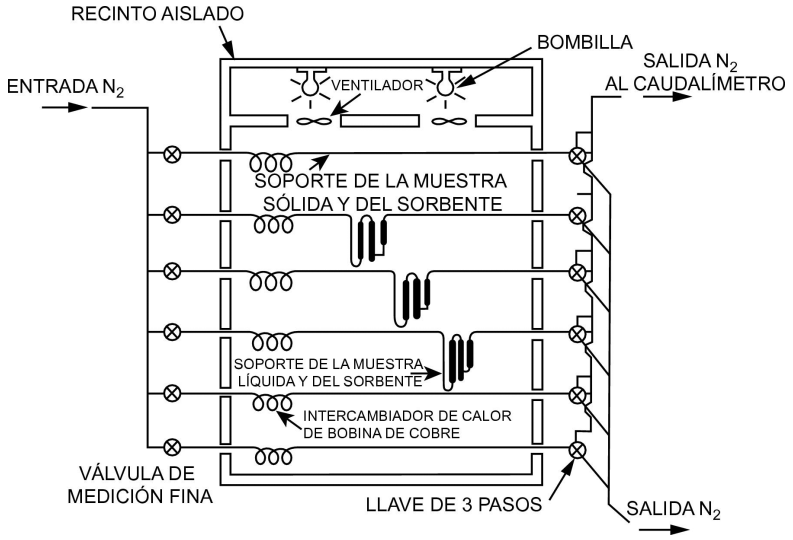
El procedimiento de saturación de gases, aplicable a sustancias sólidas o líquidas, puede utilizarse para presiones de vapor de un mínimo de 10^{-10} Pa (10) (11) (12) (13) (14). El método, no obstante, es más fiable para las presiones de vapor inferiores a 10^3 Pa, ya que, por encima de este valor, suele arrojar resultados superiores a los reales, probablemente a causa de la formación de aerosoles. Dado que las medidas de la presión de vapor se toman a temperatura ambiente, no es necesario extrapolar los datos obtenidos a temperaturas más elevadas, evitándose así un proceso que a menudo genera errores graves.

1.5.7.2. *Aparato*

El procedimiento precisa del uso de un recinto a temperatura constante. El esquema de la figura 8 muestra un recinto con tres soportes para muestras líquidas y otros tantos para sólidas, que permiten realizar un triple análisis de una muestra líquida o sólida. La temperatura se controla con un margen máximo de ± 0,5 °C.

▼**M1**

Figura 8



En general se utiliza nitrógeno como gas inerte de arrastre, pero en ocasiones puede resultar necesario usar otro gas (24). El gas de arrastre debe estar seco. La corriente de gas se divide en seis subcorrientes controladas por válvulas de aguja (con orificio de aproximadamente 0,79 mm) y se introduce en el recinto mediante tubos de cobre de 3,8 mm de diámetro (d.i.) Tras equilibrar la temperatura, el gas fluye a través de la muestra y el colector de sorbente y sale del recinto.

Las muestras sólidas se cargan en tubos de vidrio de 5 mm de d.i. entre tapones de lana de vidrio (véase la figura 9). La figura 10 muestra un soporte para muestras líquidas y el sistema sorbente. El método más reproducible de medir la presión de vapor de un líquido es recubrir con él perlas de vidrio o un sorbente inerte tal como sílice y rellenar bien el soporte con estas bolas. Alternativamente, se puede hacer pasar el gas de arrastre por un filtro grosero de frita y hacer que borbotee a través de una columna de la sustancia problema líquida.

Figura 9

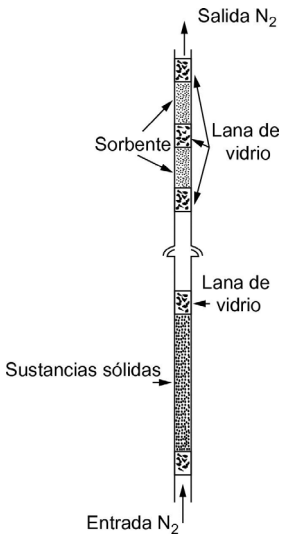
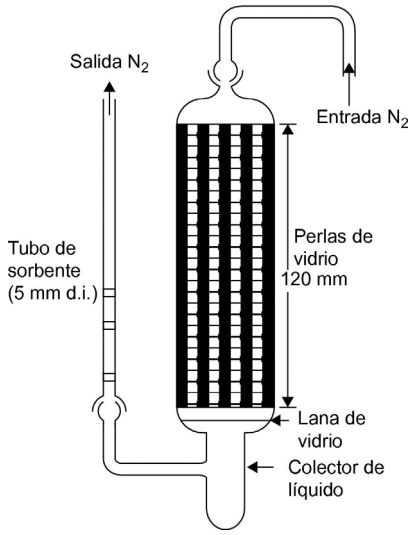


Figura 10



▼M1

El sistema sorbente contiene una sección frontal y otra de reserva. A presiones de vapor muy bajas, el sorbente retiene solamente cantidades muy pequeñas y la adsorción en la lana de vidrio y en los tubos de vidrio entre la muestra y el sorbente puede convertirse en un problema grave.

Otra manera eficiente de recoger el material vaporizado es el uso de colectores enfriados con CO_2 sólido. No inducen contrapresión en la columna del saturador y permiten una fácil retirada cuantitativa del material recogido.

1.5.7.3. *Procedimiento*

Se mide el caudal del gas de arrastre efluente a la temperatura ambiente. Debe comprobarse frecuentemente dicho caudal durante el experimento para garantizar que se dispone de un valor exacto del volumen total del gas de arrastre. Lo ideal es el seguimiento permanente con un caudalímetro de masa. La saturación de la fase gaseosa puede exigir un tiempo de contacto considerable y, en consecuencia, unos caudales de gas muy bajos (25).

Al concluir el experimento, se analizan separadamente las secciones de sorbente frontal y de reserva. Se procede a la desorción del compuesto en cada sección mediante la adición de un disolvente y se analizan cuantitativamente las soluciones resultantes para determinar el peso desorbido en cada una de ellas. El método analítico que se seleccione (así como el sorbente y el disolvente de desorción) dependerá de la naturaleza del material problema. La eficiencia de la desorción se determinará inyectando una cantidad conocida de muestra en el sorbente, desorbiéndola y analizando la cantidad recuperada. Es importante comprobar la eficiencia de la desorción a la concentración de la muestra en las condiciones de ensayo, o próxima a ella.

Para garantizar que el gas de arrastre esté saturado con la sustancia problema, se utilizarán tres caudales distintos. Si la presión de vapor calculada no muestra dependencia del caudal, se dará por supuesto que el gas está saturado.

La presión de vapor se calculará utilizando la ecuación:

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

donde:

p = presión de vapor (Pa)

W = masa de sustancia problema evaporada (g)

V = volumen de gas saturado (m^3)

R = constante universal de los gases 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = masa molar de la sustancia problema (g mol^{-1})

Los volúmenes medidos deben corregirse para tener en cuenta las diferencias de presión y temperatura entre el caudalímetro y el saturador.

▼M1

1.5.8. **Rotor**

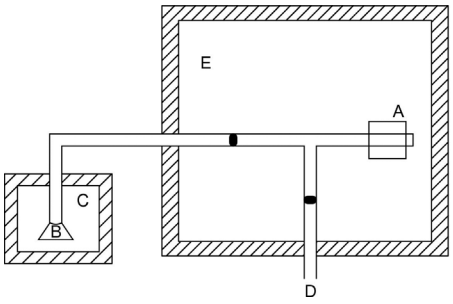
1.5.8.1. *Principio*

Este método utiliza un viscosímetro de rotor cuyo elemento medidor es una bolita de acero suspendida en un campo magnético que se hace girar mediante campos rotatorios (26) (27) (28). Unas bobinas de detección permiten medir la velocidad de giro. Cuando la bola alcanza una velocidad angular dada (generalmente, unas 400 revoluciones por segundo), se interrumpe la activación y se produce el frenado debido a la fricción con el gas. Se mide entonces el descenso de la velocidad angular en función del tiempo. La presión de vapor se deduce del frenado, dependiente de la presión, de la bola de acero. El intervalo recomendado es de 10^{-4} a 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Aparato*

En la figura 11 se muestra un esquema de montaje experimental. El cabezal de medida se coloca en un recinto termostatizado (regulado con una precisión de 0,1 °C) y el recipiente con la muestra se coloca en un recinto aparte, igualmente regulado con un margen de 0,1 °C. Todas las demás partes del montaje se mantienen a una temperatura superior con el fin de evitar la condensación. El conjunto del equipo se conecta a un sistema de alto vacío.

Figura 11



2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. 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 y 50 °C, para comprobar la linealidad de la curva de la presión de vapor. En los casos del método de efusión (celda de Knudsen y termogravimetría isotérmica) y del método de saturación de gases, se recomienda 120 a 150 °C, en lugar de 0 a 50 °C, como intervalo de temperaturas de medición.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

— método utilizado,

▼**M1**

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— al menos dos valores de presión de vapor y temperatura —y preferiblemente tres o más— en el intervalo comprendido entre 0 y 50 °C (o entre 120 y 150 °C),

— al menos una de las temperaturas debe ser igual o inferior a 25 °C, si técnicamente lo permite el método elegido,

— todos los datos originales,

— una gráfica de log p frente a 1/T,

— una estimación de la presión de vapor a 20 o 25 °C.

En caso de transición (cambio de estado, descomposición), hay que incluir:

— naturaleza del cambio,

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

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

Deben incluirse todas las informaciones y observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

3. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 383 A, 26-47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

(3) Weissberger, R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

(6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — Temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000). Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982), 161-168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995), 27-31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998), 1512-20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796 (1993), pp. 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott *et al*. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Apéndice

Método de estimación

INTRODUCCIÓN

Los valores estimados de la presión de vapor pueden utilizarse:

— para decidir cuál de los métodos experimentales es el adecuado,

— para dar una estimación o un valor límite en casos en que los métodos experimentales no puedan aplicarse por causas técnicas.

MÉTODO DE ESTIMACIÓN

La presión de vapor de las sustancias líquidas y sólidas puede estimarse utilizando la correlación de Watson modificada (a). El único dato experimental necesario es el punto de ebullición normal y el método es aplicable en el intervalo de presiones comprendido entre 10^5 y 10^{-5} Pa.

Se encontrará información detallada sobre este método en el «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (b). Véase igualmente OECD Environmental Monograph No.67 (c).

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

La presión de vapor se calcula mediante la fórmula:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1}\ln\frac{T}{T_b}\right]$$

donde:

T = temperatura correspondiente

T_b = punto normal de ebullición

P_{vp} = presión de vapor a la temperatura T

ΔH_{vb} = calor de vaporización

ΔZ_b = factor de compresibilidad (estimado en 0,97)

m = factor empírico que depende del estado físico a la temperatura correspondiente

Además,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8,75 + R \ln T_b)$$

donde K_F es un factor empírico que tiene en cuenta la polaridad de la sustancia. La referencia (b) contiene los factores K_F de varios tipos de compuestos.

▼**M1**

Es frecuente disponer de datos en los que figura un punto de ebullición a presión reducida. En estos casos, la presión de vapor se calcula mediante la fórmula:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_l}\left[1 - \left(3 - 2\,\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\,\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

donde T_1 es el punto de ebullición a la presión reducida P_1.

INFORME

Cuando se aplique el método de estimación, el informe incluirá una documentación completa de los cálculos.

BIBLIOGRAFÍA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. TENSIÓN SUPERFICIAL

1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en la referencia (2).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos descritos se aplican a la medida de la tensión superficial de las soluciones acuosas.

Antes de efectuar el ensayo, es conveniente disponer de información preliminar sobre la solubilidad en el agua, la estructura, las propiedades de hidrólisis y la concentración crítica para la formación de micelas de la sustancia.

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

Las medidas de la tensión superficial por el método del tensiómetro de anillo se limita a las soluciones acuosas con una viscosidad dinámica inferior a 200 mPa s, aproximadamente.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La entalpia de superficie libre por unidad de superficie constituye la tensión superficial.

Esta última se expresa en:

N/m (en unidades SI) o

mN/m (en subunidades SI)

1 N/m = 10^3 dinas/cm

1 mN/m = 1 dina/cm en el sistema CGS (en desuso).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una sustancia nueva. Se deben utilizar esencialmente para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

En las referencias (1) y (3) se señalan sustancias de referencia que cubren una amplia gama de tensiones superficiales.

1.4. PRINCIPIOS DE LOS MÉTODOS

Los métodos se basan en la medida de la fuerza máxima que es preciso ejercer verticalmente sobre una brida o anillo en contacto con la superficie del líquido estudiado, colocado en un recipiente adecuado, a fin de separarlo de dicha superficie, o sobre una placa, uno de cuyos bordes esté en contacto con la superficie, a fin de elevar la película formada.

Las sustancias que sean hidrosolubles al menos a la concentración de 1 mg/1 se someterán al ensayo en solución acuosa a una sola concentración.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La precisión de los métodos descritos es mayor de la que normalmente se requiere en la evaluación del riesgo para el medio ambiente.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Se prepara una solución de la sustancia en agua destilada. La concentración de esta solución debe ser el 90 % de la concentración de saturación de la sustancia en agua; si esta concentración es superior a 1 g/1, se utilizará para el ensayo la concentración de 1 g/1. Las sustancias cuya solubilidad en agua es inferior a 1 mg/1 no tienen que someterse al ensayo.

1.6.1. **Método de la placa**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.2. **Método de la brida**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.3. **Método del anillo**

Véase ISO 304y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.4. **Método de) anillo armonizado por la OCDE**

1.6.4.1. *Aparato*

Para efectuar esta medida pueden emplearse tensiómetros comerciales. Constan de los elementos siguientes:

— un portamuestras móvil,

— un dinamómetro,

— un cuerpo de medida (anillo),

— un recipiente de medida.1.6.4.1.1.

1.6.4.1.1. Portamuestras móvil

El portamuestras móvil sirve de soporte al recipiente de medida termostatizado, que contiene el líquido problema. Va montado en la misma peana que el dinamómetro.

1.6.4.1.2. Dinamómetro

El dinamómetro (véase la figura) va colocado por encima del portamuestras. El error en la medida de la fuerza no debe pasar de $\pm 10^{-6}$ N, lo que equivale a un límite de error de ± 0,1 mg en una medida de masa. En la mayoría de los casos, la escala de medidas de los tensiómetros vendidos en el mercado está calibrada en mN/m, de manera que se puede leer directamente la tensión superficial en mN/m con una precisión de 0,1 mN/m.

▼B

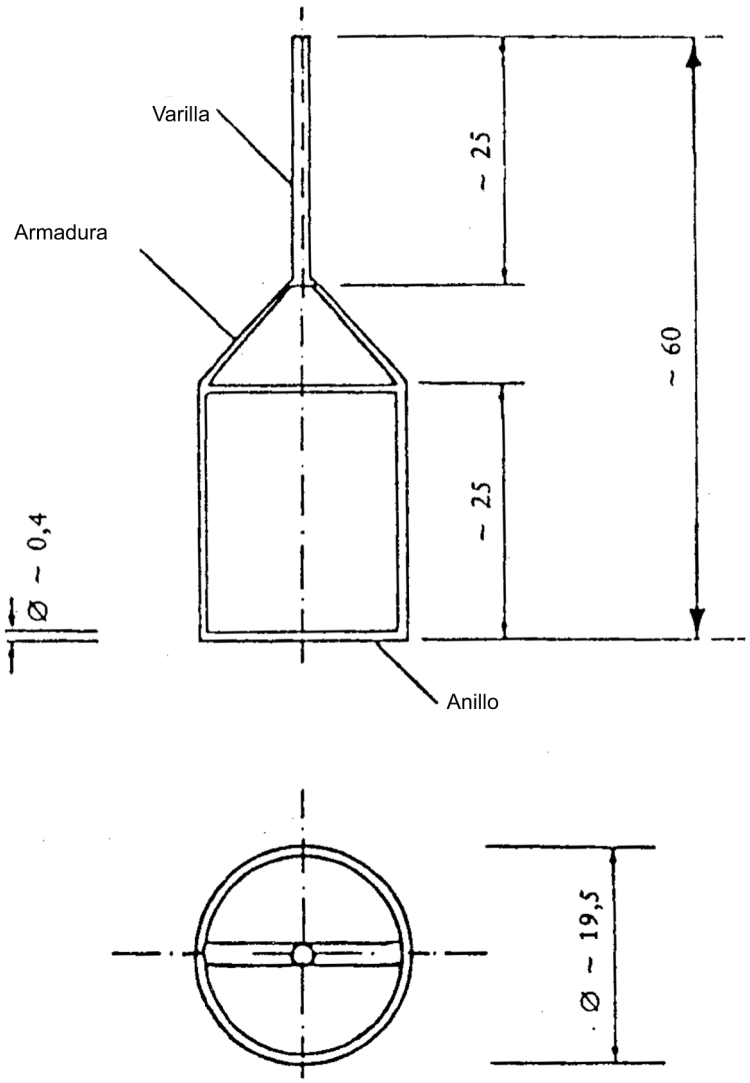
1.6.4.1.3. Cuerpo de medida (anillo)

El anillo suele estar formado por un hilo de platino-iridio de 0,4 mm de grosor, aproximadamente, y una circunferencia media de 60 mm. Dicho anillo está suspendido horizontalmente de una armadura que va unida por una varilla metálica al dinamómetro (véase la figura).

Figura

Cuerpo de medida

(todas las dimensiones se expresan en milímetros)



1.6.4.1.4. Recipiente de medida

El recipiente de medida que contiene la solución problema debe ser un recipiente de vidrio termostatizado. Debe estar diseñado de manera que, durante la determinación, la temperatura del líquido y de la fase gaseosa por encima de su superficie se mantenga constante y no haya evaporación. Los recipientes cilíndricos de vidrio de un diámetro interior de, al menos, 45 mm cumplen estos requisitos.

▼B

1.6.4.2. *Preparación del aparato*

1.6.4.2.1. Limpieza

Los recipientes de vidrio deben limpiarse con cuidado. Si es necesario se lavarán con mezcla sulfocrómica caliente y, a continuación, con ácido fosfórico viscoso (83 a 98 % en peso de H_3PO_4); se enjuagarán abundantemente con agua corriente y luego con agua bidestilada hasta el momento en que se obtenga reacción neutra; finalmente, se secarán o bien se enjuagarán con parte del líquido que se va a medir.

El anillo se limpiará con abundante agua para eliminar todos los restos de sustancias solubles en agua, se sumergerá unos segundos en mezcla sulfocrómica, se enjuagará con agua bidestilada hasta que se obtenga reacción neutra y, finalmente, se secará rápidamente sobre una llama de metanol.

Nota:

Los restos de sustancias que no se disuelvan ni se destruyan con la mezcla sulfocrómica ni con el ácido fosfórico, como las siliconas, deberán ser eliminadas con un disolvente orgánico apropiado.

1.6.4.2.2. Calibrado del aparato

La validación del aparato consiste en comprobar el punto cero y en ajustarlo de tal manera que la indicación dada por el aparato permita una determinación fiable en mN/m.

Montaje:

Se nivelará el aparato, por ejemplo con un nivel de burbuja colocado sobre la peana y con tornillos de nivelación.

Ajuste del punto cero:

Después de montar el anillo en el aparato y antes de sumergirlo en el líquido, debe ajustarse a cero el indicador del tensiómetro y comprobarse el paralelismo del anillo con la superficie del líquido. A tal fin, puede utilizarse la superficie del líquido como espejo.

Calibrado:

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

a) con una masa: este procedimiento consiste en utilizar cumiapesos 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 determina mediante la ecuación (1):

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

donde

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masa del contrapeso (g)

g = aceleración de la gravedad (981 cm.s-2 a nivel del mar)

b = circunferencia media del anillo (cm)

E_a = lectura del tensiómetro tras colocación del contrapeso sobre el anillo (mN/m);

▼B

b) con agua: este procedimiento utiliza agua pura cuya tensión superficial, por ejemplo a 23 ºC, es igual a 72,3 mN/m. Es más rápido que el sistema anterior, pero siempre existe el riesgo de que ¡a tensión superficial del agua se vea modificada por restos de tensioactivos.

El factor de calibradoΦ_b, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del aparato, se determina mediante la ecuación siguiente (2);

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

donde

σ_0 = valor dado en la bibliografía para la tensión superficial del agua (mN/m) a la temperatura elegida para el ensayo

σ_g = valor medido de la tensión superficial de¡ agua (mN/m) a esa misma temperatura.

1.6.4.3. *Preparación de la muestra*

Las soluciones acuosas de la sustancia se prepararán teniendo en cuenta las concentraciones exigidas. Es imprescindible que la disolución de la sustancia sea completa.

La solución así preparada debe mantenerse a una temperatura constante (± 0,5 ºC). Dado que la tensión superficial de una solución colocada en el recipiente de medida se modifica después de cierto tiempo, deben efectuarse varias medidas en momentos diferentes y hay que trazar una curva de la tensión superficial en función del tiempo. Cuando ya no haya modificaciones, se habrá alcanzado un estado de equilibrio.

El polvo o los vapores de otras sustancias falsean la medida. La operación debe realizarse bajo una campana de protección.

1.6.5. **Condiciones del ensayo**

Las medidas deben efectuarse a una temperatura de unos 20 ºC, sin variaciones de temperatura superiores a ± 0,5 ºC.

1.6.6. **Desarrollo del ensayo**

Se vierte en el recipiente de medida, cuidadosamente limpio, la solución que se desea medir, procurando evitar la formación de burbujas y, a continuación, se coloca el recipiente de medida en el portamuestras, elevándolo hasta que el anillo quede sumergido bajo la superficie de la solución. Entonces se vuelve a bajar gradual y uniformemente (a una velocidad de unos 0,5 cm/min) el portamuestras para separar ei anillo de la superficie hasta llegar a la fuerza máxima. La capa de líquido adherida al anillo no debe desprenderse de este. Una vez acabada la medida, se sumerge de nuevo el anillo y se repiten las medidas hasta que se obtenga un valor de tensión superficial constante. En cada determinación se anotará el tiempo que haya transcurrido desde la transferencia de la solución al recipiente de medida. Las lecturas deben registrarse en el valor máximo de la fuerza necesaria para retirar el anillo de la superficie del líquido.

▼B

2. **RESULTADOS**

Para calcular la tensión superficial se multiplicará primero el valor leído en el aparato en mN/m por el factor de calibrado Φ_a o Φ_b(según el procedimiento de calibrado utilizado). Se obtendrá entonces un valor solo aproximadoque, a continuación, deberá corregirse.

Harkins y Jordán (4) han establecido de manera empírica factores de corrección para los valores de tensión superficial obtenidos por el método del anillo, que dependen de las dimensiones del anillo, de la densidad del líquido y de su tensión superficial.

Dada la laboriosidad del proceso de determinación del factor de corrección para cada medida a partir de las tablas de Harkins y Jordán, en las soluciones acuosas se admite la utilización de un procedimiento simplificado de lectura de la tensión superficial tomando directamente los valores corregidos de la tabla siguiente (se recurrirá a la interpolación en las lecturas que se sitúen entre dos valores de la tabla).

Tabla

Corrección de los valores medidos de la tensión superficial

Válido solamente para las soluciones acuosas p = 1 g/cm^3

R	= 9,55 mm (radio medio del anillo)
r	= 0,185 mm (radio del hilo que constituye el anillo)

Valor experimental (mN/m)	Valor corregido (mN/m)	
	Calibrado con contrapeso [véase el punto 1.6.4.2.2.(a)]	Calibrado con agua [véase el punto 1.6.4.2.2.(b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
.42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valor experimental (mN/m)	Valor corregido (mN/m)	
	Calibrado con contrapeso [véase el punto 1.6.4.2.2.(a)]	Calibrado con agua [véase el punto 1.6.4.2.2.(b)]
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Esta tabla se ha elaborado a partir de la corrección de Harkins Jordan, y es similar a la de la norma DIN (DIN 53914) para agua y soluciones acuosas (densidad p = 1 g/cm^3); se utiliza con un anillo existente en el mercado cuyas dimensiones son R = 9,55 mm (radio medio del anillo) y r = 0,185 mm (radio del hilo que constituye el anillo). La tabla da los valores corregidos de las medidas de tensión superficial efectuadas tras un calibrado con contrapesos o con agua.

Otra posibilidad, sin calibrado previo, consiste en calcular la tensión superficial por medio de la fórmula siguiente:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

donde

F = fuerza medida en el dinamómetro en el punto de ruptura de la película

R = radio del anillo

f = factor de corrección (1).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEI ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— método utilizado,

— tipo de agua o de solución utilizada,

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

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

▼B

— concentración de la solución,

— temperatura del ensayo,

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

— evolución de la tensión superficial de la solución con el tiempo a partir del momento en que se haya transferido al recipiente de medida,

— deben señalarse todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, especialmente lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que el agua destilada tiene una tensión superficial de 72,75 mN/m a 20 ºC, se considerarán sustancias tensioactivas aquellas que presenten una tensión superficial inferior a 60 mN/m en las condiciones de este método.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Interscience Publ., Nueva York, 1959, vol. I, Part I.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, Vol. 48, 511

(4) Harlcins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, Vol. 52, 1751.

▼M4

A.6. **HIDROSOLUBILIDAD**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 105 de la OCDE (1995). Es una versión revisada de las TG 105 original que se adoptaron en 1981. No hay diferencias esenciales entre la versión actual y la de 1981. Se ha modificado fundamentalmente el formato. La revisión está basada en el método de ensayo de la UE "Hidrosolubilidad" ([1]).

CONSIDERACIONES INICIALES

2. La hidrosolubilidad de una sustancia puede verse considerablemente afectada por la presencia de impurezas. El presente método se dirige a determinar la hidrosolubilidad de sustancias esencialmente puras que son estables en agua y no volátiles. Antes de proceder al ensayo, es conveniente disponer de información sobre la sustancia problema, como la fórmula estructural, la presión de vapor, la constante de disociación y la hidrólisis como función del pH.

3. En el presente documento se describen dos métodos de ensayo, el método de elución en columna y el método del frasco, que abarcan respectivamente solubilidades por debajo y por encima de 10^{-2} g/l. Se describe además un ensayo preliminar sencillo. Este permite determinar aproximadamente la cantidad adecuada de muestra que deberá emplearse en el ensayo final, así como el tiempo necesario para conseguir la saturación.

DEFINICIONES Y UNIDADES

4. La hidrosolubilidad de una sustancia es la concentración de saturación en masa de la sustancia en el agua a una temperatura determinada.

5. Se expresa en masa de soluto por volumen de solución. La unidad SI es el kg/m^3, pero se puede utilizar también g/l.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

6. No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se analice una sustancia problema.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Condiciones del ensayo

7. El ensayo debe efectuarse, a ser posible, a 20 ° C ± 0,5 ° C. La temperatura elegida se mantendrá constante en todas las partes importantes del equipo.

Ensayo preliminar

8. De manera gradual, añadir volúmenes crecientes de agua a temperatura ambiente a alrededor de 0,1 g de muestra (las sustancias sólidas deben estar reducidas a polvo) en una probeta de 10 ml con tapón de vidrio. Después de la adición de cada cantidad de agua, agitar vigorosamente la mezcla durante 10 minutos y luego comprobar visualmente si contiene partículas de muestra no disueltas. Si después de añadir 10 ml de agua la muestra o determinadas partes de esta no se han disuelto, hay que proseguir el experimento en una probeta de 100 ml. La solubilidad aproximada se indica, en el cuadro 1, bajo

▼M4

el volumen de agua en que se efectúa la disolución completa de la muestra. Cuando la solubilidad es baja, puede hacer falta mucho tiempo para que se disuelva la sustancia problema, por lo que habrá que esperar como mínimo 24 horas. Si al cabo de 24 horas la sustancia problema sigue sin disolverse, hay que dejar más tiempo (96 horas como máximo) o bien proceder a una nueva dilución a fin de determinar si hay que utilizar el método de elución en columna o el método del frasco.

Cuadro 1

ml de agua en que se disuelven 0,1 g de soluto	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilidad aproximada en g/l	< 1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	< 1

Método de elución en columna

Principio

9. Este método se basa en la elución con agua de la sustancia problema en una microcolumna cargada con un material soporte inerte previamente cubierto con un exceso de sustancia problema (2). La hidrosolubilidad viene determinada por la concentración en masa del eluato cuando ha alcanzado una meseta en función del tiempo.

Aparato

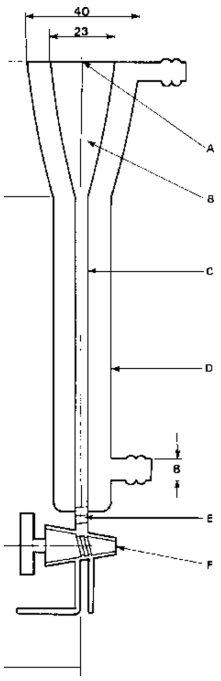
10. El aparato consiste en una microcolumna (figura 1) que se mantiene a temperatura constante. Está conectado a una bomba de recirculación (figura 2) o a un recipiente de nivelación (figura 3). La microcolumna contiene un soporte inerte retenido por un pequeño tapón de lana de vidrio que servirá también para separar las partículas por filtración. Como soporte se pueden emplear bolas de cristal, tierra de diatomeas u otros materiales inertes.

11. La microcolumna representada en la figura 1 es idónea para funcionar con una bomba de recirculación. Tiene un espacio de cabeza correspondiente a cinco volúmenes de lecho de agua (desechados al principio del ensayo) y una capacidad para cinco muestras (tomadas para análisis durante el ensayo). No obstante, se puede reducir la dimensión si es posible añadir agua al sistema durante el ensayo para reemplazar los cinco volúmenes de lecho iniciales, eliminados con las impurezas. La columna se conectará mediante tubos de material inerte a la bomba de recirculación, que será capaz de suministrar aproximadamente 25 ml/hora. Como bomba de recirculación se podrá utilizar, por ejemplo, una bomba peristáltica o una bomba de membrana. Hay que procurar que el material del tubo no sea causa de contaminación ni adsorción.

12. En la figura 3 se muestra el esquema de un sistema con recipiente de nivelación. En este sistema la microcolumna lleva acoplada una llave de una vía. La conexión al recipiente de nivelación se hace mediante una junta de vidrio esmerilado y tubos de material inerte. El caudal del recipiente de nivelación deberá ser de unos 25 ml/hora.

▼**M4**

Figura 1



Dimensiones en mm

A Conexión para la junta de vidrio esmerilado

B. Espacio de cabeza

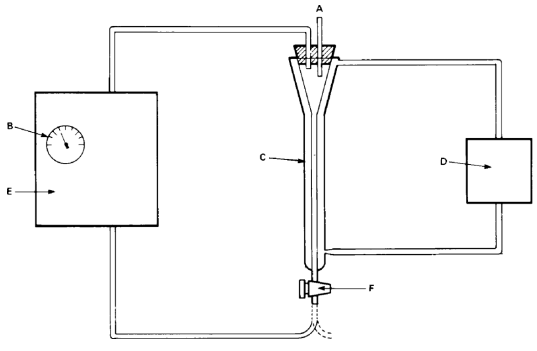
C. Diámetro interior 5

D. Diámetro exterior 19

E. Tapón de lana de vidrio

F. Llave

Figura 2



A Equilibrio con la atmósfera

B. Caudalímetro

C. Microcolumna

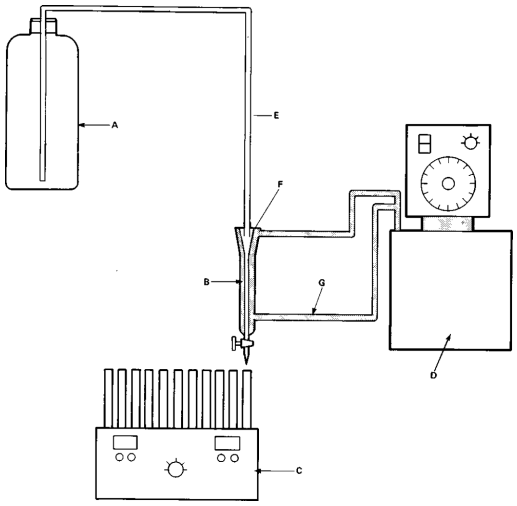
D. Bomba de circulación termostatizada

E. Bomba de recirculación

F. Llave de dos vías para la toma de muestras

▼M4

Figura 3



A. Recipiente de nivelación (por ejemplo, frasco de 2,5 litros)

B. Columna

C. Acumulador de fracciones

D. Termostato

E. Tubo de teflón

F. Junta de vidrio esmerilado

G. Tubo para la circulación de agua entre el termostato y la columna, con un diámetro interior de aproximadamente 8 mm

13. Pesar unos 600 mg de material soporte y pasarlos a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Disolver una cantidad idónea de la sustancia problema en un disolvente volátil con calidad de reactivo analítico y añadir al soporte una cantidad adecuada de esta solución. El disolvente debe evaporarse por completo, por ejemplo en un rotavapor; de lo contrario, no se daría la saturación en agua del soporte durante la etapa de elución, debido al efecto de partición en la superficie. Dejar que se empape el soporte cargado de esta forma durante 2 horas en 5 ml de agua, aproximadamente, y luego pasar la suspensión a la microcolumna. También se podrá verter el soporte cargado seco en la microcolumna llena de agua y a continuación equilibrar después durante 2 horas.

14. La carga del soporte puede plantear dificultades que lleven a resultados erróneos, por ejemplo si la sustancia problema se deposita en forma de aceite. Las dificultades deben examinarse y han de recogerse los datos correspondientes.

Procedimiento empleado con una bomba de recirculación

15. Se inicia la circulación a través de la columna. El caudal recomendado es de 25 ml/hora, aproximadamente, que equivale a unos 10 volúmenes de lecho por hora para la columna arriba descrita. Se descartan como mínimo los 5 primeros volúmenes de lecho a fin de eliminar las impurezas solubles en el agua. Luego se conecta la bomba de recirculación, haciendo funcionar el aparato hasta llegar al estado de equilibrio, definido por 5 muestras sucesivas cuyas concentraciones no difieran de forma aleatoria en más del ± 30 %. Dichas muestras deben estar separadas entre sí por un intervalo de tiempo correspondiente al paso de al menos 10 volúmenes de lecho. Dependiendo del método analítico aplicado, puede ser preferible establecer una curva de concentración/tiempo para comprobar que se ha alcanzado el equilibrio.

▼M4

Procedimiento empleado con un recipiente de nivelación

16. Se recogerán las sucesivas fracciones de eluato y se analizarán según el método elegido. Para determinar la hidrosolubilidad, se utilizarán las fracciones procedentes del intervalo medio de elución cuyas concentraciones sean constantes en el intervalo de ± 30 %, al menos en 5 fracciones consecutivas.

17. Como eluyente se recomienda usar agua bidestilada. También puede usarse agua desionizada con una resistividad superior a 10 megaohms/cm y un contenido de carbono orgánico total menor del 0,01 %.

18. Con ambos procedimientos se repetirá la operación, reduciendo el caudal a la mitad. Si los resultados de las dos operaciones concuerdan, la prueba es satisfactoria. Si se observa una solubilidad aparente más elevada con el caudal inferior, se continuará con la reducción del caudal a la mitad hasta que se obtenga la misma solubilidad en dos operaciones sucesivas.

19. Con ambos procedimientos se debe controlar la posible presencia de materia coloidal en las fracciones estudiando la aparición del efecto Tyndall. La presencia de partículas invalida el ensayo, y este deberá repetirse después de mejorar la eficacia de la filtración de la columna.

20. Se medirá el pH de cada muestra, preferiblemente con ayuda de tiras indicadoras específicas.

Método del frasco

Principio

21. La sustancia problema (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 deja enfriar la mezcla y se mantiene a la temperatura de ensayo. Otra posibilidad es realizar la medida directamente a la temperatura de ensayo siempre que, mediante un muestreo adecuado, se garantice que se ha alcanzado el equilibrio de saturación. Luego, se determina con un método analítico apropiado la concentración en masa de la sustancia problema en la solución acuosa, que no debe contener ninguna partícula sin disolver (3).

Aparato

22. Se necesita el siguiente instrumental:

— material de vidrio e instrumentos de laboratorio normales,

— un dispositivo para agitar las disoluciones a temperatura constante controlada,

— si se precisa en el caso de las emulsiones, una centrífuga (preferiblemente termostatizada), y

— equipo analítico.

Procedimiento

23. Evaluar, a partir del ensayo preliminar, la cantidad de sustancia problema necesaria para saturar el volumen de agua elegido. Pesar aproximadamente cinco veces dicha cantidad en cada uno de tres recipientes de vidrio con tapón, también de vidrio (por ejemplo, tubos de centrífuga, matraces). Añadir a cada recipiente un volumen de agua determinado en función del método analítico y del intervalo de solubilidad. Los frascos se tapan firmemente y se agitan después a 30 °C. Utilizar un dispositivo agitador o mezclador que pueda actuar a temperatura constante como, por ejemplo, un agitador magnético en baño de agua termostatizado. Un día después, tomar uno de los recipientes y equilibrar durante 24 horas a la temperatura del ensayo, agitando de vez en cuando. El contenido del recipiente se centrifuga

▼M4

luego a la temperatura del ensayo y se determina la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa clara utilizando un método analítico adecuado. Los otros dos recipientes se tratan de la misma manera, después de un primer equilibrado a 30 °C durante dos y tres días, respectivamente. Si las concentraciones medidas en al menos los dos últimos recipientes no difieren en más del 15 %, la prueba es satisfactoria. Si los resultados de los recipientes 1, 2 y 3 acusan una tendencia a la progresión, repetir de nuevo todo el ensayo utilizando tiempos de equilibrado más largos.

24. El ensayo se puede realizar también sin preincubar a 30 °C. Para evaluar la velocidad de adquisición del equilibrio de saturación se irán tomando muestras hasta que el tiempo de agitación deje de influir en las concentraciones medidas.

25. Se medirá el pH de cada muestra, preferiblemente con ayuda de tiras indicadoras específicas.

Determinaciones analíticas

26. Es preferible utilizar un método específico de la sustancia, pues pequeñas cantidades de impurezas solubles pueden originar errores sensibles en la solubilidad medida. Pueden citarse como ejemplos los siguientes métodos: cromatografía de gases o de líquidos, valoración volumétrica, fotometría y voltametría.

DATOS E INFORME

Datos

Método de elución en columna

27. En cada operación debe calcularse el valor medio y la desviación típica de al menos cinco muestras consecutivas tomadas durante la meseta de saturación. Los valores medios obtenidos en dos ensayos con caudales diferentes no deberán diferir en más del 30 %.

Método del frasco

28. A partir de los resultados de cada uno de los tres recipientes, que no deberán diferir en más del 15 %, se calcularán las medias.

Informe del ensayo

Método de elución en columna

29. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

— resultados del ensayo preliminar,

— identidad química e impurezas (etapa de purificación preliminar, en su caso),

— concentraciones individuales, caudales y pH de cada muestra,

— desviación típica y media de al menos cinco muestras tomadas durante la meseta de saturación de cada operación,

— promedio de al menos dos operaciones sucesivas,

— temperatura del agua durante el proceso de saturación,

— método de análisis,

— naturaleza del material de soporte,

— carga del material de soporte,

— disolvente utilizado,

— cualquier signo de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia problema.

▼**M4**

Método del frasco

30. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

— resultados del ensayo preliminar,

— identidad química e impurezas (etapa de purificación preliminar, en su caso),

— resultados analíticos individuales y su media cuando se determine más de un valor para un mismo recipiente,

— pH de cada muestra,

— media de los valores de los diferentes recipientes cuando concuerden,

— temperatura del ensayo,

— método analítico,

— cualquier signo de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia problema.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Directiva 92/69/CEE de la Comisión, de 31 de Julio de 1992, por la que se adapta al progreso técnico, por decimoséptima vez, la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (DO L 383 de 29.12.1992, p. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼B

A.8. COEFICIENTE DE REPARTO

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de información preliminar sobre la fórmula desarrollada, la constante de disociación, la hidrosolubilidad, la hidrólisis, la solubilidad en n-octanol y la tensión superficial de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Las medidas relativas a sustancias ionizables deben hacerse solo con la forma no ionizada (ácido libre o base libre) obtenida mediante el uso de una solución amortiguadora con un pH que esté al menos una unidad de pH por debajo (ácido libre) o por encima (base libre) del pK.

Este método de ensayo incluye dos procedimientos distintos: el método de frasco de agitación y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El primero puede aplicarse cuando el valor de log P_{ow} (véanse más abajo las definiciones) está en el intervalo de - 2 a 4, y el segundo cuando está en el intervalo de 0 a 6. Antes de llevar a cabo ninguno de los procedimientos experimentales es necesario obtener una estimación previa del coeficiente de reparto.

El método de frasco de agitación es aplicable solo a sustancias esencialmente puras solubles en agua y n-octanol, y no es aplicable a productos tensoactivos (para los que debe darse su valor calculado o una estimación basada en las solubilidades en n-octanol y agua por separado).

El método de CLAR no puede aplicarse a ácidos o bases fuertes, complejos metálicos, materiales tensoactivos ni sustancias que reaccionen con el eluyente. Para estos materiales debe darse un valor calculado o una estimación basada en las solubilidades en n-octanol y agua por separado.

El método de CLAR es menos sensible a la presencia de impurezas en el compuesto problema que el método de frasco de agitación. Sin embargo, las impurezas pueden hacer en algunos casos que la interpretación de los resultados sea difícil porque la atribución de los picos resulte dudosa. En el caso de mezclas que den una banda sin resolución, hay que establecer los límites superior e inferior de log P.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El coeficiente de reparto (P) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio (c_i) de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles. En el caso del n-octanol y del agua:

$$p_{ow} = \frac{c_n - \text{octanol}}{c_{water}}$$

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

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Método de frasco de agitación

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se investiga una nueva sustancia. Deben servir esencialmente para comprobar de vez en cuando la eficacia del método y para comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

Método de CLAR

Con el fin de relacionar los datos medidos según la CLAR de un compuesto con su P, hay que trazar una gráfica de calibración (log P — datos cromatográficos) con al menos 6 puntos de referencia. La selección de las sustancias de referencia adecuadas depende del criterio del analista. Siempre que sea posible, al menos una sustancia de referencia debe tener un P_{ow} superior al de la sustancia problema, y otra un P_{ow} inferior al de la sustancia problema. En el caso de valores de log P inferiores a 4, la calibración puede basarse en datos obtenidos por el método de frasco de agitación. En el caso de valores de log P superiores a 4, la calibración puede basarse en valores validados aparecidos en la bibliografía, siempre que estos valores estén de acuerdo con los valores calculados. Para mayor precisión, es preferible elegir compuestos de referencia que estén relacionados estructuralmente con la sustancia problema.

Se dispone de amplias listas de valores de log P_{ow} de muchos grupos de productos químicos (2) (3). Si no se tienen datos sobre los coeficientes de reparto de compuestos relacionados estructuralmente, puede utilizarse entonces una calibración más general, establecida con otros compuestos de referencia.

En el apéndice 2 se recoge una relación de sustancias de referencia recomendadas con sus valores de P_{ow}.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

1.4.1. **Método de frasco de agitación**

Para determinar un coeficiente de reparto, es necesario conseguir un equilibrio entre los elementos constitutivos del sistema que se influencien mutuamente y determinar las concentraciones de las sustancias disueltas en las dos fases. Examinando la bibliografía existente sobre este tema, se encuentra que pueden utilizarse varias técnicas diferentes para resolver este problema, es decir, la mezcla completa de las dos fases, seguida de su separación, que permita determinar la concentración en equilibrio de la sustancia de ensayo.

1.4.2. **Método de CLAR**

La CLAR se realiza en columnas analíticas rellenas de una fase sólida comercializada con cadenas hidrocarbonadas largas (C_8, C_{18}, por ejemplo) unidas por enlaces químicos a la sílice. Los productos químicos inyectados en esta columna la recorrerán a diferente velocidad debido a los diferentes grados de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria hidrocarbonada. Las mezclas de productos químicos se eluyen por orden de hidrofobicidad, saliendo antes los productos hidrosolubles y después los liposolubles, según su coeficiente de reparto hidrocarburo-agua. Esto permite establecer una relación entre el tiempo de retención en una columna de este tipo (de fase inversa) y el coeficiente de reparto n-octanol/agua. El coeficiente de reparto se deduce del factor de capacidad k, dado por la expresión

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

donde t_R = tiempo de retención de la sustancia problema y t_o = tiempo medio que necesita una molécula de disolvente para recorrer la columna (tiempo muerto).

No es necesario utilizar métodos analíticos cuantitativos, sino solo determinar los tiempos de elución.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

1.5.1. **Repetibilidad**

Método de frasco de agitación

Para obtener un coeficiente de reparto preciso, se harán determinaciones por duplicado en tres series de condiciones de ensayo diferentes, pudiendo variar tanto la cantidad de sustancia especificada como la relación de volumen de los disolventes. Los logaritmos de los valores determinados del coeficiente de reparto deberán situarse en un intervalo de ± 0,3 unidades logarítmicas.

Método de CLAR

Para aumentar la confianza de la medida, deben hacerse las determinaciones por duplicado. Los valores de log P procedentes de las distintas medidas deben estar dentro de un intervalo de ± 0,1 unidades logarítmicas.

1.5.2. **Sensibilidad**

Método de frasco de agitación

El intervalo de medida del método está determinado por el límite de detección del procedimiento analítico. Esto debe ser suficiente para evaluar los valores de log P_{ow} en el intervalo de - 2 a 4 (a veces, bajo ciertas condiciones, este intervalo puede ampliarse hasta un log P_{ow} de 5), cuando la concentración del soluto en cada fase no sobrepase los 0,01 moles por litro.

Método de CLAR

El método de CLAR permite la evaluación de coeficientes de reparto en el intervalo de log P_{ow} entre 0 y 6.

En principio, el coeficiente de reparto de un compuesto puede estimarse en el margen de ± 1 unidad logarítmica del valor obtenido con el frasco de agitación. En la bibliografía se encuentran correlaciones típicas (4) (5) (6) (7) (8). Normalmente puede obtenerse mayor precisión cuando los gráficos de correlación se basan en compuestos de referencia relacionados estructuralmente (9).

▼B

1.5.3. **Especificidad**

Método de frasco de agitación

La ley de reparto de Nernst solo se aplica a temperatura, presión y pH constantes para las soluciones diluidas. Estrictamente se aplica a una sustancia pura dispersada entre dos disolventes puros. Los resultados pueden ser modificados por la aparición simultánea, en una o ambas fases, de varios solutos diferentes.

La disociación o la asociación de las moléculas disueltas se traduce en desviaciones respecto a la ley de reparto citada. Estas desviaciones se observan porque el coeficiente de reparto pasa a depender entonces de la concentración de la solución.

Debido a los múltiples equilibrios implicados, este método de ensayo no debe aplicarse sin corregir a los compuestos ionizables. Para estos compuestos debe considerarse la utilización de soluciones amortiguadoras en lugar de agua; el pH de la solución amortiguadora debe diferir del pKa de la sustancia al menos en una unidad de pH y hay que tener en cuenta la importancia de este pH para el medio ambiente.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Estimación preliminar del coeficiente de reparto**

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse preferentemente mediante un método de cálculo (véase el apéndice 1), o bien, cuando sea adecuado, utilizando la relación de las solubilidades de la sustancia de ensayo en los disolventes puros (10).

1.6.2. **Método de frasco de agitación**

1.6.2.1. *Preparación*

n-Octanol: la determinación del coeficiente de reparto debe hacerse recurriendo a un reactivo de calidad analítica.

Agua: utilizar agua destilada o bidestilada procedente de un aparato de cristal o de cuarzo. En el caso de compuestos ionizables, puede ser necesario utilizar soluciones amortiguadoras en lugar de agua.

Nota:

Evitar el agua extraída directamente de un intercambiador de iones.

1.6.2.1.1. Presaturación de los disolventes

Antes de determinar un coeficiente de reparto, se saturan recíprocamente las fases del sistema de disolventes agitándolas a la temperatura de ensayo. Para realizar esto, es preciso agitar durante 24 horas, en un agitador mecánico, dos grandes frascos que contengan n-octanol puro de calidad analítica o agua, con una cantidad suficiente del otro disolvente y dejarlos reposar hasta que se separen las fases y se alcance el estado de saturación.

▼B

1.6.2.1.2. Preparación para el ensayo

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

— estimación preliminar del coeficiente de reparto (véase más arriba),

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

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

Se efectúan tres ensayos. En el primero se utiliza la relación calculada de volúmenes de n-octanol y agua, en el segundo se divide por dos esta relación, y en el tercero se multiplica por dos esta relación (por ejemplo, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Sustancia de ensayo

Se prepara una solución de reserva en n-octanol presaturado con agua. La concentración de esta solución de reserva debe determinarse con precisión antes de utilizarla para determinar el coeficiente de reparto. Esta solución deberá guardarse en condiciones que garanticen su estabilidad.

1.6.2.2. *Condiciones de ensayo*

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

1.6.2.3. *Procedimiento de medida*

1.6.2.3.1. Establecimiento del equilibrio de reparto

Para cada serie de condiciones de ensayo, preparar recipientes de ensayo por duplicado con las cantidades requeridas, cuidadosamente medidas, de los dos disolventes, así como la cantidad necesaria de solución de reserva.

Medir los volúmenes de las fases de n-octanol. Colocar en un agitador apropiado o agitar a mano los recipientes de ensayo. En caso de usar un tubo para centrifugar, un método que se recomienda consiste en hacer girar rápidamente 180 grados alrededor de su eje transversal el tubo, de forma que el aire que pudiera haber quedado retenido atraviese las dos fases. La experiencia muestra que 50 giros de este tipo suelen ser suficientes para establecer el equilibrio de reparto. Para mayor seguridad, se recomienda hacer 100 giros en 5 minutos.

1.6.2.3.2. Separación de las fases

Cuando sea necesario para separar las fases, centrifugar la mezcla. Efectuar esta operación con una centrífuga de laboratorio mantenida a temperatura ambiente o, si se utiliza una centrífuga sin control de temperatura, equilibrar los tubos de centrífuga a la temperatura de ensayo durante por lo menos una hora antes del análisis.

▼B

1.6.2.4. *Análisis*

Para determinar el coeficiente de reparto, es necesario analizar las concentraciones de la sustancia de ensayo en las dos fases. Para ello, se puede extraer una alícuota de cada una de las dos fases de cada tubo, para cada serie de condiciones de ensayo, y analizarlas según el procedimiento elegido. Debe calcularse la cantidad total de sustancia presente en las dos fases y compararla con la cantidad introducida inicialmente.

La muestra de la fase acuosa debe tomarse por un procedimiento que reduzca al mínimo el riesgo de incorporar trazas de n-octanol: para ello se puede utilizar una jeringuilla de cristal con aguja intercambiable; en primer lugar hay que llenar parcialmente de aire la jeringuilla y a continuación expulsarlo lentamente mientras se va introduciendo al mismo tiempo la aguja a través de la capa de n-octanol. Extraer un volumen adecuado de fase acuosa. Retirar rápidamente la jeringuilla de la solución y quitar la aguja. El contenido de la jeringuilla se podrá utilizar entonces como muestra acuosa. La concentración en las dos fases diferentes deberá determinarse, preferentemente, mediante un procedimiento específico de la sustancia. Algunos ejemplos de métodos analíticos que pueden ser adecuados son:

— métodos fotométricos,

— cromatografía en fase gaseosa,

— cromatografía líquida de alta resolución.

1.6.3. **Método de CLAR**

1.6.3.1. *Preparación*

Aparatos

Se necesita un cromatógrafo de líquidos, dotado de una bomba de caudal constante y un instrumento de detección adecuado. Es recomendable el uso de una válvula de inyección con circuito de inyección. La presencia de grupos polares en la fase estacionaria puede afectar gravemente al funcionamiento de la columna de CLAR; por tanto, las fases estacionarias deben presentar la mínima proporción posible de grupos polares (11). Pueden utilizarse rellenos de fase inversa con micropartículas o columnas ya rellenas, disponibles comercialmente. Puede ponerse una columna de seguridad entre el sistema de inyección y la columna de análisis.

Fase móvil

Para preparar el disolvente de elución, del que se eliminarán los gases disueltos antes de utilizarlo, se empleará metanol para CLAR y agua para CLAR. Se empleará la elución isocrática. Se utilizarán mezclas de metanol/agua en que el contenido mínimo de agua será del 25 %. La mezcla típica de metanol-agua en la proporción de 3:1 (v/v) es satisfactoria para eluir compuestos de log P 6 en el plazo de una hora con un caudal de 1 ml/min. En el caso de compuestos de mayor log P puede ser necesario abreviar el tiempo de elución (y el de los compuestos de referencia) disminuyendo la polaridad de la fase móvil o la longitud de la columna.

Las sustancias muy poco solubles en n-octanol tienden a dar valores de log P_{ow} anormalmente bajos con el método de CLAR; los picos de estos compuestos acompañan a veces al frente de disolvente. Esto se debe probablemente al hecho de que el proceso de reparto es demasiado lento como para alcanzar el equilibrio en el tiempo necesario normalmente en una separación por CLAR. Si se disminuye el caudal y/o se baja la proporción metanol/agua es posible obtener un valor fiable.

▼B

Las sustancias de ensayo y de referencia deben ser solubles en la fase móvil en concentraciones suficientes para permitir su detección. Solo podrán añadirse aditivos a la mezcla metanol-agua en casos excepcionales, ya que los aditivos cambian las propiedades de la columna. Si se trata de cromatogramas con aditivos, es obligatorio utilizar una columna independiente del mismo tipo. Si la mezcla metanol-agua no es adecuada, pueden utilizarse otras mezclas de disolventes orgánicos con agua, como etanol-agua o acetonitrilo-agua.

El pH del eluyente es fundamental para los compuestos ionizables. Debe situarse en el intervalo de pH de funcionamiento de la columna, que suele estar entre 2 y 8. Se recomienda el uso de soluciones amortiguadoras, Hay que evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna que se producen con algunas mezclas de fase orgánica con soluciones amortiguadoras. Las medidas de CLAR con fases estacionarias a base de sílice con el pH superior a 8 no son recomendables porque el uso de una fase móvil alcalina puede provocar una rápida alteración de las características de la columna.

Solutos

Los compuestos de referencia deben tener la mayor pureza posible. Si es posible, los compuestos que se vayan a utilizar en el ensayo o en la calibración se disolverán en la fase móvil.

Condiciones de ensayo

La temperatura durante las medidas no debe variar más de ± 2 K.

1.6.3.2. ***Medida***

Cálculo del tiempo muerto t_0

El tiempo muerto t_0 puede determinarse utilizando una serie homóloga (por ejemplo, n-alquil-metil-cetonas) o bien compuestos orgánicos no retenidos (por ejemplo, tiourea o formamida). Para calcular el tiempo muerto t_0 utilizando una serie homóloga, se inyectarán al menos 7 miembros de una serie homóloga y se determinarán sus respectivos tiempos de retención. Los tiempos de retención, medidos directamente, $t_{r\,(n_c + 1)}$, se representan gráficamente en función de $t_{r(n_c)}$ y se determinan la ordenada en el origen a y la pendiente b de la ecuación de regresión:

$$t_{r(n_c + 1)} = a + b\ t_{r(n_c)}$$

siendo n_c = número de átomos de carbono. El tiempo muerto t_0 viene dado por:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

▼B

Gráfico de calibración

El paso siguiente es construir una gráfica de correlación de log k frente a log P para los compuestos de referencia adecuados. En la práctica, se inyecta simultáneamente una serie de 5 a 10 compuestos patrón de referencia cuyo log P esté alrededor del intervalo supuesto, y se determinan los tiempos de retención, preferiblemente con un integrador-registrador unido al sistema de detección. Se calculan los respectivos logaritmos de los factores de capacidad, log K, y se representan en función del log P determinado según el método de frasco de agitación. La calibración se realiza a intervalos regulares, al menos una vez al día, de forma que puedan tenerse en cuenta los posibles cambios en las características de la columna.

Determinación del factor de capacidad de la sustancia de ensayo

Se inyecta la cantidad más pequeña posible de sustancia de ensayo en fase móvil. Se determina (por duplicado) el tiempo de retención para calcular el factor de capacidad k. A partir de la gráfica de correlación de los compuestos de referencia puede interpolarse el coeficiente de reparto de la sustancia de ensayo. Cuando los coeficientes de reparto son muy altos o muy bajos es necesario hacer una extrapolación y en estos casos hay que tener muy en cuenta los límites de confianza de la línea de regresión.

2. **RESULTADOS**

Método de frasco de agitación

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

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— cuando no puedan aplicarse los métodos (por ejemplo, con productos tensoactivos), habrá que dar un valor calculado o una estimación a partir de las solubilidades en n-octanol y agua por separado,

— toda la información y las observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, especialmente en lo relativo a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

Para el método de frasco de agitación:

— resultado de la estimación previa, en su caso,

— temperatura de la determinación,

— datos sobre los procedimientos analíticos utilizados para determinar las concentraciones,

— tiempo y velocidad de la centrifugación, en su caso,

▼B

— concentraciones medidas en ambas fases en cada determinación (es decir, hay que indicar un total de 12 concentraciones),

— peso de la sustancia de ensayo, volumen de cada fase empleado en cada recipiente de ensayo y cantidad calculada total de sustancia de ensayo presente en cada fase tras el equilibrado,

— valores calculados del coeficiente de reparto (P) y media de cada conjunto de condiciones de ensayo, así como la media de todas las determinaciones. Si hay alguna indicación de que el coeficiente de reparto puede variar con la concentración, habrá que señalarlo en el informe,

— desviación típica de los distintos valores de P respecto a su media,

— media del valor P de todas las determinaciones, expresada también en logaritmo decimal,

— valor teórico calculado de P_{ow} cuando este valor se haya determinado o cuando el valor medido sea superior a 10^4,

— pH del agua utilizada y fase acuosa durante la prueba,

— si se utilizan soluciones amortiguadoras, hay que justificar su uso en lugar del agua e indicar su composición, concentración y pH, así como el pH de la fase acuosa antes y después del ensayo.

Para el método de CLAR:

— resultado de la estimación previa, en su caso,

— sustancias de ensayo y de referencia, con sus purezas,

— intervalo de temperatura de las determinaciones,

— pH al que se hacen las determinaciones,

— características de las columnas de análisis y de seguridad, fase móvil y sistema de detección,

— datos de la retención y valores de log P de la bibliografía correspondiente a las sustancias de referencia utilizadas en la calibración,

— datos de la recta de regresión ajustada (log K frente a log P),

— datos de retención media y valor interpolado de log P del compuesto problema,

— descripción del equipo y condiciones de funcionamiento,

— perfiles de elución,

— cantidades de sustancias problema y de referencia introducidas en la columna,

— tiempo muerto y método para medirlo.

▼B

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch y A.J. Leo, Substituent Constants for Correlaticn Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Proiect. 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström y K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1981, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt y R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 212.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky y A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa y E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (editado por E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker y H.M. de Kort, Euro. J Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, Vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmenta] Constant, Elsevicr, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth y P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1 459.

(16) A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani y E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1 207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson y G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.

(19) D.S. Brown y E.W. Flagg,]. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel y K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weínheim, Nueva York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Apéndice 1

Métodos de cálculo y estimación

INTRODUCCIÓN

En *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a) se ofrece una introducción general de los métodos de cálculo, junto con datos y ejemplos.

Los valores calculados de P_{ow} pueden utilizarse:

— para decidir cuál de los métodos experimentales es adecuado (intervalo del método de frasco de agitación: log P_{ow} entre — 2 y 4; intervalo del método de CLAR: log P_{ow} entre 0 y 6),

— para seleccionar las condiciones de ensayo adecuadas (por ejemplo, sustancias de referencia para procedimientos de CLAR, relación de volúmenes n-octanol/agua para el método de frasco de agitación),

— como control interno del laboratorio para detectar posibles errores experimentales,

— para dar una estimación de P_{ow} en casos en que los métodos experimentales no puedan aplicarse por causas técnicas.

MÉTODO DE ESTIMACIÓN

Estimación previa del coeficiente de reparto

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse a partir de las solubilidades de la sustancia problema en los disolventes puros:

$$P_{estimado} = \frac{c_{n-octanol} \text{ de saturación}}{c_{agua} \text{ de saturación}}$$

MÉTODOS DE CÁLCULO

Principio de los métodos de cálculo

Todos los métodos de cálculo se basan en la fragmentación formal de la molécula en subestructuras adecuadas de las que se conocen incrementos fiables de log P_{ow}. El log P_{ow} de toda la molécula se calcula entonces como la suma de los valores de los fragmentos correspondientes más unos términos de corrección por las interacciones intramoleculares.

Existen listas de constantes de fragmentos y términos de corrección (b) (c) (d) (e). Algunas se actualizan periódicamente (b).

Criterios cualitativos

En general, la habilidad del método de cálculo va disminuyendo al aumentar la complejidad del compuesto estudiado. En el caso de moléculas simples de bajo peso molecular y uno o dos grupos funcionales, puede esperarse una desviación de 0,1 a 0,3 unidades logarítmicas de P_{ow} entre los resultados de los diferentes métodos de fragmentación y el valor medido. Si se trata de moléculas más complejas, el margen de error puede ser mayor, dependiendo de la fiabilidad y disponibilidad de constantes de fragmentos, así como de la capacidad de detectar interacciones intramoleculares (por ejemplo, enlaces de hidrógeno) y del uso adecuado de los términos de corrección (problema menos arduo con los programas de ordenador CLOGP-3) (b). En el caso de compuestos ionizados, es importante considerar correctamente la carga o el grado de ionización.

▼B

Procedimientos de cálculo

Método de π de Hansch

La constante del sustituyente hidrofóbico original, π, introducida por Fujita *et al.* (f) se define como:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

donde P_{ow} (PhX) es el coeficiente de reparto de un derivado aromático y P_{ow} (PhH) el del compuesto original.

(P.y. $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

Según esta definición, el método de π es aplicable principalmente a la sustitución aromática. Se han tabulado los valores de π de gran número de sustituyentes (b) (c) (d) y se utilizan para calcular el log P_{ow} de moléculas o subestructuras aromáticas.

Método de Rekker

Según Rekker (g), el valor de log P_{ow} se calcula de la manera siguiente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j$$

donde f_i representa las constantes de los diferentes fragmentos moleculares y a_i la frecuencia de su aparición en la molécula estudiada. Los términos de corrección pueden expresarse como integral múltiple de una sola constante C_m (llamada «constante mágica»). Las constantes de fragmentos f_i y C_m se han obtenido a partir de una lista de 1 054 valores experimentales de P_{ow} (825 compuestos) mediante análisis de regresión múltiple (c) (h). La determinación de los términos de interacción se lleva a cabo según normas establecidas recogidas en a bibliografía (e) (h) (i).

Método de Hansch-Leo

Según Hansch y Leo (c), el valor de log P_{ow} se calcula de la forma siguiente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

donde f_i representa las constantes de los diferentes fragmentos moleculares; F_j, los términos de corrección, y a_i y b_j las frecuencias correspondientes de presencia. A partir de valores experimentales de P_{ow}, se establecieron por el método de tanteo una lista de valores de fragmentos atómicos y de grupos y una lista de términos de corrección F_j (llamados «factores»). Los términos de corrección se han ordenado en varias clases diferentes (a) (c). Es bastante complicado y exige mucho tiempo el tener en cuenta todas las normas y los términos de corrección. Se han ideado programas informáticos (b).

Método combinado

El cálculo de log P_{ow} de moléculas complejas puede mejorarse considerablemente si se divide la molécula en grandes subestructuras de las que se conozcan valores fiables de log P_{ow} a partir de listas (b) (c) o por mediciones propias. Estos fragmentos (por ejemplo, heterociclos, antraquinona, azobenceno) pueden combinarse con los valores π de Hansch o con las constantes de fragmentos de Rekker o Leo.

Observaciones

i) Los métodos de cálculo solo pueden aplicarse a compuestos parcial o completamente ionizados, si es posible tener en cuenta los necesarios factores de corrección.

▼B

ii) Si puede suponerse la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares, hay que añadir los correspondientes términos de corrección (aproximadamente, de + 0,6 a + 1,0 unidades logarítmicas de P_{ow}) (a). La presencia de tales enlaces puede suponerse a partir de modelos estéricos o datos espectroscópicos de la molécula.

iii) Si son posibles varias formas tautoméricas, debe usarse como base para el cálculo la forma más probable.

iv) Hay que seguir cuidadosamente las revisiones de las listas de constantes de fragmentos.

Informe

Cuando se utilicen métodos de cálculo/estimación, el informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— descripción de la sustancia (mezcla, impurezas, etc.),

— indicación de cualquier posible enlace de hidrógeno intramolecular, disociación, carga o cualquier otro efecto poco común (por ejemplo, tautomería),

— descripción del método de cálculo,

— indicación o suministro de la base de datos,

— peculiaridades de la selección de los fragmentos,

— documentación exhaustiva de los cálculos.

BIBLIOGRAFÍA

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl y D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Nueva York, 1983.

(b) Pomona College, Medical Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa y C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, vol. 1 Elsevier, Nueva York, 1977.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington D. C, 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Apéndice 2

Sustancias de referencia recomendadas para el método de CLAR

№	Sustancia de referencia	log P_{ow}	pKa
1	2-Butanona	0,3	
7	4-Acetilpiridina	0,5	
3	Anilina	0,9	
4	Acetanilida	1,0	
5	Alcohol bencílico	1,1	
6	p-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Ácido fenoxiacético	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitrilo	1,6	
11	Fenilacetonitrilo	1,6	
12	Alcohol 4-metilbencílico	1,6	
13	Acetofenona	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	Ácido 3-nitrobenzoico	1,8	pKa = 3,47
16	4-Cloranilina	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenceno	1,9	
18	Alcohol cinámico	1,9	
19	Ácido benzoico	1,9	pKa = 4,19
20	p-Cresol	1,9	pKa = 10,17
21	Ácido cinámico	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisol	2,1	
23	Metilbenzoato	2,1	
24	Benceno	2,1	
25	Ácido 3-metilbenzoico	2,4	pKa = 4,27
26	4-Clorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Tricloroetileno	2,4	
28	Atrazina	2,6	
29	Etilbenzoato	2,6	
30	2,6-Diclorobenzonitrilo	2,6	
31	Ácido 3-clorobenzoico	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueno	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dicloroanilina	2,8	
35	Clorobenceno	2,8	
36	Alil-feniléter	2,9	
37	Bromobenceno	3,0	

▼B

№	Sustancia de referencia	log P_{ow}	pKa
38	Etilbenceno	3,2	
39	Benzofenona	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diclorobenceno	3,4	
43	Difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	Nafraleno	3,6	
45	Fenilbenzoato	3,6	
46	Isopropilbenceno	3,7	
47	2,4,6-Triclorofenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenilo	4,0	
49	Bencilbenzoato	4,0	
50	2,4-Dinitro-6 sec. butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triclorobenceno	4,2	
52	Ácido dodecanoico	4,2	
53	Difeniléter	4,2	
54	n-Butilbenceno	4,5	
55	Fenantreno	4,5	
56	Fluoranteno	4,7	
57	Dibencilo	4,8	
58	2,6-Difenilpiridina	4,9	
59	Trifenilamina	5,7	
60	DDT	6,2	
	Otras sustancias de referencia de bajo log P_{ow}		
1	Ácido nicotínico	-0,07	

▼B

A.9. PUNTO DE INFLAMACIÓN

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos preliminares sobre la inflamabilidad de la sustancia antes de proceder al ensayo. Este procedimiento es aplicable a las sustancias líquidas cuyos vapores pueden ser inflamados por fuentes de ignición. Los métodos de ensayo descritos en el presente documento solo son válidos para los intervalos de punto de inflamación especificados en cada uno de los distintos métodos.

A la hora de seleccionar el método hay que tener en cuenta las posibles reacciones químicas entre la sustancia y el soporte de la muestra.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El punto de inflamación es la temperatura mínima, corregida a una presión de 101,325 kPa, a la cual un líquido desprende vapores, en las condiciones definidas en el método de ensayo, en una cantidad tal que se produzca una mezcla vapor/aire inflamable en el recipiente del ensayo.

Unidad: ºC

$t = T - 273{,}15$

(t en ºC y T en K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se examina una nueva sustancia. Su principal función es la de servir para comprobar las características del método de vez en cuando y comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se coloca la sustancia en un recipiente de ensayo y se calienta o se enfría hasta la temperatura de ensayo según el procedimiento descrito en cada método concreto. Se hacen pruebas de ignición para observar si la muestra se inflama o no a la temperatura de ensayo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

1.5.1. **Repetibilidad**

La repetibilidad depende del intervalo del punto de inflamación y del método de ensayo utilizado; máximo 2 ºC.

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).

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Se coloca una muestra de la sustancia problema en un aparato de ensayo, de conformidad con los puntos 1.6.3.1 y/o 1.6.3.2.

Por seguridad, se recomienda para sustancias energéticas o tóxicas seguir un método que exija una muestra pequeña, alrededor de 2 cm^3.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

Se debe instalar el aparato lejos de corrientes de aire, siempre que esto no suponga ningún problema de seguridad.

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

1.6.3.1. *Método de equilibrio*

Véanse las normas ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. *Métodos de no equilibrio*

Aparato Abel:

Véanse las normas BS 2000, parte 170, NF M07-011 y NF T66-009.

Aparato Abel-Pensky:

Véanse las normas EN 57, DIN 51755 primera parte (para temperaturas de 5 a 65 ºC), DIN 51755 segunda parte (para temperaturas inferiores a 5 ºC) y NF M07-036.

Aparato Tag:

Véase la norma ASTM D-56.

Aparato Pensky-Martens:

Véanse las normas ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 y NF M07-019.

Observaciones:

Cuando el punto de inflamación determinado por un método de no equilibrio del punto 1.6.3.2 tiene los siguientes valores: 0 ± 2 ºC, 21 ± 2 ºC o 55 ± 2 ºC, es conveniente confirmarlo mediante un método de equilibrio utilizando el mismo aparato.

Únicamente se pueden utilizar para la notificación los métodos que puedan dar la temperatura del punto de inflamación.

Para determinar el punto de inflamación de líquidos viscosos (pinturas, gomas, etc.) que contengan disolventes, solo se pueden utilizar los aparatos y métodos de ensayo que permitan determinar el punto de inflamación de los líquidos viscosos.

Véanse las normas ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 y DIN 53213 primera parte.

▼B

2. **RESULTADOS**

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— descripción del método utilizado, así como cualquier desviación,

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

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ninguna.

▼B

A.10. INFLAMABILIDAD (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos preliminares sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia antes de proceder al ensayo.

El presente método solo es aplicable a las sustancias en polvo, granulosas o pastosas.

Para no englobar todas las sustancias que pueden inflamarse, sino únicamente aquellas que se queman muy rápidamente o cuya forma de combustión es, de una forma u otra, particularmente peligrosa, solo se considerarán como fácilmente inflamables las sustancias cuya velocidad de combustión sobrepase un cierto límite.

Puede ser especialmente peligroso que la incandescencia se propague a través de un polvo metálico debido a las dificultades para apagar un fuego. Los polvos metálicos se considerarán fácilmente inflamables si permiten la difusión de la incandescencia en toda su masa en un tiempo especificado.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo de combustión expresado en segundos.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifican.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia se dispone formando una mecha o cinta continua de unos 250 mm de longitud y se hace un ensayo exploratorio previo para determinar si, al aplicar una llama de gas, se produce la propagación de la combustión con llama o sin ella. Si se produce la propagación a lo largo de 200 mm de la mecha dentro de un tiempo dado, hay que realizar un ensayo completo para determinar la velocidad de combustión.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Ensayo exploratorio previo**

Se pone la sustancia formando una mezcla o cinta continua de unos 250 mm de longitud, 20 mm de anchura y 10 mm de altura, sobre una placa incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica. Una llama fuerte procedente de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm) se aplica a un extremo de la mecha hasta que el polvo empieza a arder o durante un máximo de 2 minutos (5 minutos si se trata de polvos de metales o de aleaciones metálicas). Hay que observar si la combustión se propaga a lo largo de 200 mm de la mecha durante un período de prueba de 4 minutos (o 40 minutos si se trata de polvos metálicos). Si la sustancia no se enciende ni propaga la combustión ardiendo con llama o sin ella a lo largo de 200 mm de la mecha en el plazo de 4 minutos (o 40 minutos), entonces la sustancia no debe considerarse fácilmente inflamable y no es necesario seguir con las pruebas. Si la sustancia propaga la combustión a lo largo de 200 mm de longitud de la mecha en menos de 4 minutos (o menos de 40 minutos si se trata de polvos metálicos), hay que aplicar el procedimiento descrito a continuación (puntos 1.6.2 y siguientes).

1.6.2. **Ensayo de la velocidad de combustión**

1.6.2.1. *Preparación*

En el caso de sustancias en polvo o granulosas se vierte la sustancia sin comprimir dentro de un molde de 250 mm de longitud con una sección transversal triangular de 10 mm de altura interior y 20 mm de anchura. A ambos lados del molde, en sentido longitudinal, se colocan dos placas metálicas a modo de soportes laterales, que deben sobrepasar en 2 mm el borde superior de la sección triangular transversal del molde (véase la figura). A continuación se deja caer tres veces el molde desde una altura de 2 cm, sobre una superficie dura. Si es necesario, se completa el molde de nuevo. A continuación, se retiran las placas laterales y se enrasa. Se coloca sobre el molde una placa no combustible, no porosa y de baja conductividad térmica, se le da la vuelta y se desmolda.

Las sustancias pastosas se extienden sobre una superficie no combustible, no porosa y de baja conductividad térmica, formando un cordón de 250 mm de longitud y alrededor de 1 cm^2 de sección.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

En el caso de sustancias sensibles a la humedad, hay que efectuar el ensayo lo más rápidamente posible después de retirar la sustancia del recipiente.

1.6.2.3. *Desarrollo del ensayo*

Colocar el dispositivo en el tiro de una campana de gases.

La velocidad del aire debe ser suficiente para evitar que los humos pasen al laboratorio y no debe variar mientras dure el ensayo. Alrededor del dispositivo se pondrá una pantalla.

Se utiliza una llama fuerte procedente de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm) para encender un extremo de la sustancia. Cuando la mecha ha ardido a lo largo de 80 mm, se procede a medir la velocidad de combustión a lo largo de los siguientes 100 mm.

▼B

El ensayo se repite seis veces, usando cada vez una placa fría y limpia, salvo que se obtenga antes un resultado positivo.

2. **RESULTADOS**

Para proceder a la evaluación es preciso conocer el tiempo de combustión del ensayo exploratorio previo (1.6.1) y el menor tiempo de combustión de un máximo de seis ensayos (1.6.2.3).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

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

— resultados del ensayo exploratorio previo y del ensayo de velocidad de combustión, en su caso,

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

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las sustancias pulverulentas, granulosas o pastosas se deberán considerar fácilmente inflamables cuando el tiempo de combustión de cualquier ensayo efectuado según el procedimiento descrito en el punto 1.6.2 sea inferior a 45 segundos. Deberá considerarse que los polvos metálicos o de aleaciones metálicas son fácilmente inflamables cuando puedan encenderse y la llama o la zona de reacción se extienda a toda la muestra en 10 minutos o menos.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

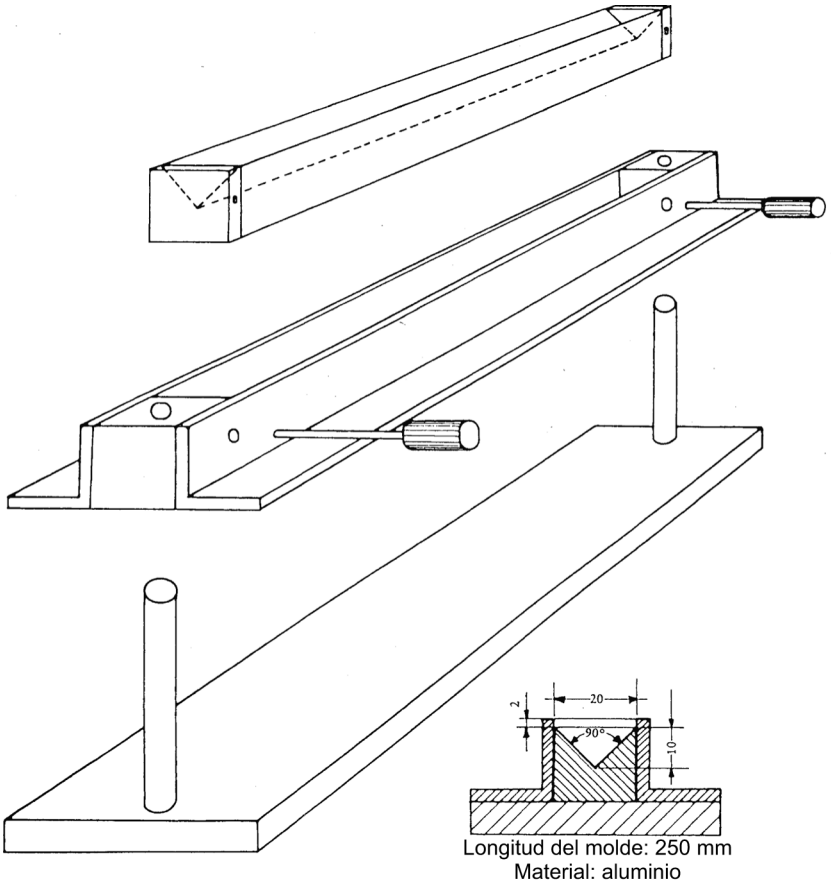
▼B

Apéndice

Figura

Molde y accesorios necesarios para la formación de las mechas

(todas las dimensiones expresadas en milímetros)



▼B

A.11. INFLAMABILIDAD (GASES)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método permite determinar si los gases mezclados con el aire a temperatura (alrededor de 20 ºC) y presión ambiente son inflamables y, en caso positivo, en qué intervalo de concentraciones. Se exponen a una chispa eléctrica mezclas que contengan concentraciones crecientes de gas problema y se observa si se produce la inflamación.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El intervalo de inflamabilidad es el intervalo de concentración entre los límites de explosión superior e inferior. Los límites de explosión superior e inferior son los límites de concentración del gas inflamable en mezcla con el aire a los que el fuego no se propaga.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

No se especifica.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se aumenta gradualmente la concentración del gas en el aire y, en cada etapa, se expone la mezcla a una chispa eléctrica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

El recipiente de ensayo es un cilindro de cristal de un diámetro interior de al menos 50 mm y una altura mínima de 300 mm, que se pone verticalmente. Los electrodos de ignición distan de 3 a 5 mm uno del otro y están situados a 60 mm del fondo del cilindro. El cilindro está equipado con una válvula para reducir la presión. El aparato debe estar protegido por un blindaje para limitar los daños de una posible explosión.

La fuente de ignición es una chispa inductiva constante de 0,5 segundos de duración, producida por un transformador de alta tensión con una tensión de salida de 10 a 15 kV (la potencia máxima es de 300 W). En la referencia (2) se describe un ejemplo de equipo adecuado.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

El ensayo debe efectuarse a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC).

▼B

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

Mediante bombas dosificadoras se llena el cilindro de cristal con una mezcla de aire y gas de concentración conocida. Se hace saltar una chispa en esta mezcla y se observa si se desprende una llama de la fuente de ignición y se propaga independientemente. Se irá aumentando la concentración de gas en un 1 % de volumen cada vez, hasta que se produzca la inflamación descrita anteriormente.

Si la estructura química del gas indica que debe ser ininflamable y puede calcularse la composición de la mezcla estequiométrica con el aire, solo será necesario someter a ensayo, en etapas del 1 %, mezclas que estén en el intervalo entre el 10 % por debajo y el 10 % por arriba de la composición estequiométrica.

2. **RESULTADOS**

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

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— descripción del aparato utilizado, mencionando las dimensiones,

— temperatura en el momento del ensayo,

— concentraciones de ensayo, así como los resultados obtenidos,

— resultado del ensayo: gas no inflamable o fácilmente inflamable,

— si se ha llegado a la conclusión de que el gas no es inflamable, se debe indicar el intervalo de concentraciones que se ha sometido a ensayo en etapas del 1 %,

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

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker y H. Schacke. «Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 126-127.

▼B

A.12. **INFLAMABILIDAD (EN CONTACTO CON EL AGUA)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

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

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

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Sustancias fácilmente inflamables: preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, desprenden una cantidad peligrosa de gases fácilmente inflamables, a una velocidad mínima de 1 l/kg por hora.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo incluye varias fases sucesivas que se describen a continuación; si la inflamación se produce en cualquiera de estas fases no es necesario proseguir el ensayo. Si se sabe que la sustancia no reacciona violentamente con el agua, se pasa directamente a la fase 4 (1.3.4).

1.3.1. **Fase 1**

Se coloca la sustancia problema en una cubeta que contenga agua destilada a 20 ºC y se observa si el gas desprendido se inflama o no.

1.3.2. **Fase 2**

Se coloca la sustancia de ensayo en un papel de filtro que flote sobre un recipiente lleno de agua destilada a 20 ºC y se observa si el gas que se desprende se inflama o no. El papel de filtro solo sirve para mantener la sustancia en un lugar, lo cual aumenta las probabilidades de inflamación.

1.3.3. **Fase 3**

Se forma con la sustancia de ensayo una pila de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro, aproximadamente. Se añaden algunas gotas de agua a la pila y se observa si el gas que se desprende se inflama o no.

1.3.4. **Fase 4**

Se mezcla la sustancia de ensayo con agua destilada a 20 ºC y se mide la velocidad de producción de gas durante 7 horas, a intervalos de una hora. Si al cabo de 7 horas la velocidad de producción es variable o va aumentando, debe prolongarse el tiempo de medida hasta un máximo de 5 días. Si, en un momento dado, la velocidad de producción supera 1 l/kg por hora, el ensayo puede darse por acabado.

▼B

1.4. SUSTANCIA DE REFERENCIA

No se especifica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

1.6.1. **Fase 1**

1.6.1.1. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC).

1.6.1.2. *Desarrollo del ensayo*

Se coloca una pequeña cantidad (aproximadamente unos 2 mm de diámetro) de la sustancia problema en una cubeta con agua destilada. Observar: i) si hay desprendimiento de gas, y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.2. **Fase 2**

1.6.2.1. *Equipo*

Papel de filtro flotando sobre una superficie de agua destilada en un recipiente adecuado, como, por ejemplo, una cubeta de evaporación de 100 mm de diámetro.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC).

1.6.2.3. *Desarrollo del ensayo*

Se coloca una pequeña cantidad de la sustancia problema (aproximadamente 2 mm de diámetro) sobre el centro del papel de filtro. Observar: i) si hay desprendimiento de gas, y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.3. **Fase 3**

1.6.3.1. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC).

1.6.3.2. *Desarrollo del ensayo*

Se forma con la sustancia de ensayo una pila de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro, aproximadamente, con un pequeño cráter en la cumbre. Se añaden algunas gotas de agua en el hueco y se observa: i) si hay desprendimiento de gas, y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

▼B

1.6.4. **Fase 4**

1.6.4.1. *Equipo*

El equipo se monta según se muestra en la figura.

1.6.4.2. *Condiciones del ensayo*

Hay que asegurarse de que el recipiente que contiene la sustancia problema está libre de partículas pulverulentas (tamaño de partícula < 500 μm). Si estas representan más del 1 % en peso del total, o si la muestra es quebradiza, hay que reducir a polvo la sustancia antes de proceder al ensayo, para tener en cuenta la reducción del tamaño de las partículas durante su almacenamiento y manipulación; en caso contrario, la sustancia se utiliza en su forma original. Debe realizarse el ensayo a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC) y a presión atmosférica.

1.6.4.3. *Desarrollo del ensayo*

Se ponen entre 10 y 20 ml de agua en el embudo cuentagotas del equipo y 10 g de sustancia en el matraz cónico. El volumen de gas producido puede medirse con cualquier método adecuado. Se abre la tapa del embudo cuentagotas para que penetre el agua en el matraz cónico y se pone en marcha un cronómetro. Se mide la producción de gas cada hora a lo largo de un período de 7 horas. Si durante este período la producción de gas es irregular o si al final del período la velocidad de producción de gas está en aumento, hay que continuar con las medidas hasta un máximo de 5 días. Si en cualquier momento de la medida la velocidad de producción de gas pasa de 1 l/kg por hora, puede interrumpirse el ensayo. Este ensayo debe realizarse por triplicado.

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

2. **RESULTADOS**

La sustancia se considera peligrosa si:

— se produce ignición espontánea en cualquier fase del desarrollo del ensayo,

o

— se produce gas inflamable a una velocidad superior a 1 l/kg de sustancia por hora.

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— datos sobre cualquier preparación inicial de la sustancia problema,

▼B

— resultados de los ensayos (fases 1, 2, 3 y 4),

— identidad química del gas desprendido,

— la velocidad de formación del gas si se realiza la fase 4 (1.6.4),

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

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

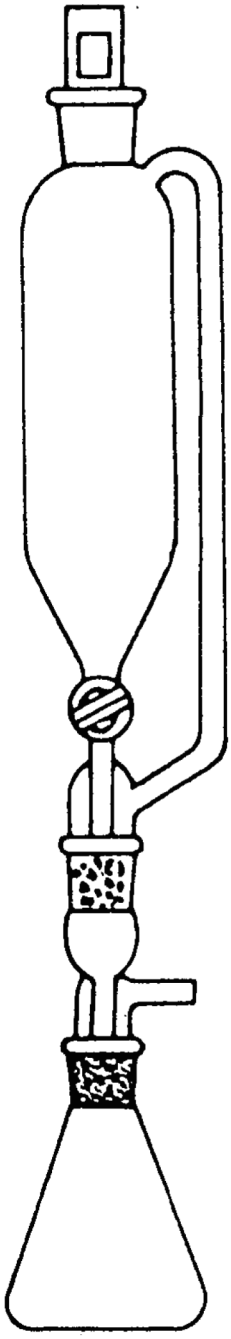
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Apéndice

Figura

Equipo



▼B

A.13. **PROPIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS Y LÍQUIDOS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

El procedimiento del ensayo es aplicable a las sustancias sólidas y liquidas que pueden inflamarse espontáneamente poco tiempo después de haber entrado en contacto con el aire a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC).

Este método de ensayo no puede aplicarse a las sustancias que tienen que exponerse al aire durante varias horas o días a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas antes de inflamarse.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Se considera que una sustancia tiene propiedades pirofóricas si, en las condiciones descritas en el punto 1.6, se inflama o se carboniza.

También puede ser necesario estudiar la autoinflamabilidad de líquidos según el método A.15. Temperatura de autoinflamación (líquidos y gases).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifican.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se añade la sustancia, sea sólida o líquida, a un soporte inerte y se pone en contacto con el aire a temperatura ambiente durante un período de 5 minutos. Si las sustancias líquidas no se inflaman, entonces se absorben en papel de filtro y se exponen al aire a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC) durante 5 minutos. Si un sólido o líquido se inflama, o un líquido inflama o carboniza a un papel de filtro, entonces se considera que la sustancia es pirofórica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Repetibilidad: debido a la importancia en relación con la seguridad, un solo resultado positivo será suficiente para considerar que la sustancia es pirofórica.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Equipo**

Llenar una cubeta de porcelana de unos 10 cm de diámetro con una capa de tierra de infusorios, de unos 5 mm de espesor, a temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC).

Observaciones:

La tierra de infusorios, o cualquier otra sustancia inerte equivalente que se obtenga fácilmente, se tomará como representativa de suelo sobre el que pudiera esparcirse la sustancia en caso de accidente.

El papel de filtro seco es necesario para el ensayo de los líquidos que no se inflaman en contacto con el aire cuando están unidos a un soporte inerte.

▼B

1.6.2. **Realización del ensayo**

a) *Sólidos pulverulentos*

Se vierten 1 o 2 cm^3 de la sustancia problema, desde una altura de alrededor de 1 m, sobre una superficie no combustible y se observa si la sustancia se inflama durante la caída o durante los primeros 5 minutos después de depositarse.

El ensayo se realiza seis veces, salvo que se produzca ignición.

b) *Líquidos*

Se vierten 5 cm^3 del líquido problema en la cubeta de porcelana preparada y se observa si la sustancia se inflama en un tiempo de 5 minutos.

Si no se observa inflamación durante estos seis ensayos, hay que realizar los siguientes ensayos:

Con una jeringuilla se ponen 0,5 ml de la sustancia en un papel de filtro dentado y se observa si se produce inflamación o carbonización del papel de filtro en el plazo de 5 minutos desde la adición del líquido. El ensayo se realiza tres veces, salvo que se produzca inflamación o carbonización.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El ensayo puede interrumpirse tan pronto como se obtenga un resultado positivo en cualquiera de las pruebas.

2.2. EVALUACIÓN

Una sustancia se considera pirofórica si se inflama en el plazo de 5 minutos cuando se añade a un soporte inerte y se expone al aire, o bien cuando la sustancia líquida carboniza o inflama un papel de filtro en el plazo de 5 minutos desde que se pone en contacto con este y se expone al aire.

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— resultado del ensayo,

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

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

▼B

A.14. PROPIEDADES EXPLOSIVAS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Se trata de un método de ensayo que permite determinar si una sustancia sólida o pastosa presenta o no peligro de explosión cuando se expone al efecto de una llama (sensibilidad térmica) o a un choque o fricción (sensibilidad a estímulos mecánicos), y si una sustancia líquida presenta peligro de explosión cuando se expone al efecto de una llama o un choque.

El método comprende tres partes:

a) un ensayo de sensibilidad térmica (1);

b) un ensayo de sensibilidad mecánica respecto al choque (1);

c) un ensayo de sensibilidad mecánica respecto a la fricción (1).

El método proporciona datos que permiten evaluar la probabilidad de inicio de una explosión por medio de algunos estímulos corrientes. No tiene por objeto determinar si una sustancia puede o no hacer explosión en cualesquiera condiciones.

El método sirve para, determinar si una sustancia presenta peligro de explosión (sensibilidad térmica y mecánica) en las condiciones específicas definidas por la Directiva. En el ensayo se utiliza un cierto número de equipos ampliamente utilizados internacionalmente (1) y que, por regla general, dan resultados convincentes. Hay que reconocer que el método no es definitivo. Pueden utilizarse equipos distintos a los especificados siempre que estén reconocidos internacionalmente y se pueda establecer una buena correlación entre los resultados obtenidos con el equipo alternativo y los del equipo especificado.

No es necesario realizar los ensayos si los datos termodinámicos disponibles (calor de formación, calor de descomposición, etc.) o la ausencia de ciertos grupos reactivos (2) en la fórmula desarrollada permiten establecer de forma razonablemente inequívoca que la sustancia no puede descomponerse rápidamente con formación de gases o liberación de calor (dicho de otro modo, si la materia no presenta ningún riesgo de explosión). No es necesario realizar un ensayo de sensibilidad a la fricción con las sustancias líquidas.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Explosivos:

Sustancias que puedan hacer explosión bajo el efecto de una llama, o que sean sensibles al choque o a la fricción en el equipo especificado (o que sean más sensibles mecánicamente que el 1,3-dinitrobenceno en un equipo alternativo).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

1,3-dinitrobenceno, producto cristalino técnico pasado por tamiz de 0,5 mm, para los métodos de fricción y choque.

Perhidro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triazina (RDX, hexogen, ciclonita — CAS 121-82-4), recristalizado a partir de ciclohexanona acuosa, tamizado por vía húmeda a través de un tamiz de 250 μm y retenido en un tamiz de 150 μm y secado a 103 ± 2 ºC durante 4 horas para la segunda serie de ensayos de fricción y choque.

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

1.4.1. **Pruebas de seguridad en la manipulación (3)**

Por razones de seguridad, antes de pasar a los ensayos principales, se someten muestras muy reducidas (unos 10 mg) de sustancia a un calentamiento sin confinamiento con llama de gas, a choque con cualquier tipo de instrumento adecuado y a fricción utilizando un mazo y un yunque, o cualquier otro tipo de instrumento que sirva para producir fricción. El objetivo es determinar si la sustancia es tan sensible y explosiva que los ensayos de sensibilidad prescritos, especialmente el de sensibilidad térmica, deban realizarse con precauciones especiales a fin de evitar cualquier daño corporal al operario.

1.4.2. **Sensibilidad térmica**

Este método consiste en calentar la sustancia en un tubo de acero cerrado por placas horadadas con agujeros de diferentes diámetros, para determinar si la sustancia puede hacer explosión en condiciones de calor intenso y un confinamiento determinado.

1.4.3. **Sensibilidad mecánica (choque)**

El método consiste en someter la sustancia al choque producido por una masa especificada que se deja caer desde una altura también especificada.

1.4.4. **Sensibilidad mecánica (fricción)**

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

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Sensibilidad térmica (efecto de la llama)**

1.6.1.1. *Equipo*

El equipo consiste en un tubo de acero no reutilizable con un sistema de cierre reutilizable (figura 1), instalado en un instrumento de calefacción y protección. Cada tubo se obtiene por embutido de una lámina de acero (véase el apéndice) y tiene 24 mm de diámetro interior, 75 mm de longitud y 0,5 mm de espesor de pared. Los tubos tienen un reborde en el extremo abierto para que se puedan cerrar con el dispositivo de la placa horadada. Este dispositivo consiste en una placa horadada resistente a la presión, con un orificio central, unido firmemente al tubo mediante una junta aterrajada en dos partes (tuerca y abrazadera de rosca); esta junta está hecha de acero al cromo-manganeso (véase el apéndice) exento de chispas hasta 800 ºC. Las placas horadadas tienen 6 mm de espesor, están hechas de acero resistente al calor (véase el apéndice) y pueden escogerse con varios diámetros de abertura.

▼B

1.6.1.2. *Condiciones del ensayo*

Normalmente se somete a ensayo la sustancia tal como llega al laboratorio, aunque en algunos casos (por ejemplo, si está prensada, fundida o condensada de alguna otra forma) puede ser necesario estudiar la sustancia después de triturarla.

Si se trata de un sólido, la masa de material que debe utilizarse en cada ensayo se determina mediante un proceso seco de dos fases. Se llena un tubo tarado con 9 cm^3 de sustancia y esta se apisona aplicando una fuerza de 80 N a toda la sección transversal del tubo. La forma de llenar el tubo puede ser distinta por razones de seguridad o en caso de que la forma física de la muestra pueda cambiar por la compresión; por ejemplo, si la sustancia es muy sensible a la fricción, no puede apisonarse. Si el material es compresible, se añade más cantidad y se vuelve a apisonar hasta que la altura del relleno queda a 55 mm de la boca. Se determina la masa total utilizada para llenar el tubo hasta el nivel de 55 mm y se hacen dos adiciones más, cada una apisonada con una fuerza de 80 N. Entonces, según sea necesario, se añade más material y se apisona o bien se extrae para dejar la altura del relleno a 15 mm de la boca. Se lleva a cabo un segundo proceso seco, empezando con una cantidad igual a un tercio de la masa total utilizada en el primer proceso seco, y se apisona esta cantidad. Se añaden otros dos incrementos de esta cantidad con apisonamiento de 80 N y se ajusta el nivel de la sustancia en el tubo a 15 mm de la boca por adición o extracción de material, según sea necesario. La cantidad de sólido determinada en el segundo proceso seco es la que se utilizará en cada ensayo; el llenado se hace en tres cantidades iguales, comprimida cada una a 9 cm^3 mediante la fuerza que sea necesaria. (Puede ser más fácil utilizar anillos separadores.)

Los líquidos y geles se cargan en el tubo hasta una altura de 60 mm teniendo especial cuidado con los geles para evitar la formación de vacíos. La abrazadera de rosca se desliza sobre el tubo desde el fondo, se inserta la placa horadada correspondiente y se aprieta la tuerca después de poner un lubricante a base de disulfuro de molibdeno. Es muy importante comprobar que no queda nada de sustancia aprisionada entre el reborde y la placa o en las roscas.

La fuente de calor es propano procedente de una botella industrial, provisto de un regulador de presión (60 a 70 mbar), que pasa a través de un contador y mediante un distribuidor se reparte en cuatro mecheros de forma equilibrada (lo que se comprueba por observación visual de las llamas de los mecheros). Los mecheros se colocan alrededor del recinto de ensayo según se indica en la figura 1. Los cuatro mecheros suponen un consumo total de unos 3,2 litros de propano por minuto. Pueden utilizarse otros mecheros y gases combustibles pero la velocidad de calentamiento debe ser la especificada en la figura 3. Independientemente del equipo utilizado, es necesario comprobar periódicamente la velocidad de calentamiento mediante tubos llenos de ftalato de dibutilo, según se indica en la figura 3.

1.6.1.3. *Desarrollo de los ensayos*

Cada ensayo se realiza hasta que el tubo esté fragmentado o el tubo se haya calentado durante 5 minutos. Si el ensayo produce la fragmentación del tubo en tres o más piezas, que en algunos casos pueden estar unidas entre sí por bandas estrechas de metal, según ilustra la figura 2, entonces se considera que el ensayo produce explosión. Un ensayo en que se produzcan menos fragmentos o no haya fragmentación se considera que no produce explosión.

▼B

Se hace primero una serie de tres ensayos con una placa de 6,0 mm de diámetro de orificio y, si no se obtienen explosiones, se hace una segunda serie de tres ensayos con una placa de 2,0 mm de diámetro de orificio. Desde el momento en que se produzca una explosión en cualquiera de las dos series de ensayos no es necesario seguir realizando ensayos.

1.6.1.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión en cualquiera de las dos series de ensayos.

1.6.2. **Sensibilidad mecánica (choque)**

1.6.2.1. *Equipo (figura 4)*

Las partes fundamentales de un equipo clásico de martinete son un bloque de acero fundido con base, yunque, columna, guías, pesos que caen, mecanismo de liberación y un soporte para las muestras. El yunque de acero (100 mm de diámetro por 70 mm de altura) se atornilla a la parte superior de un bloque de acero (230 mm de longitud por 250 mm de anchura por 200 mm de altura) con una base de fundición (450 mm de longitud por 450 mm de anchura por 60 mm de altura). En un soporte atornillado a la parte posterior del bloque de acero se fija la columna, hecha de tubo de acero estirado sin costuras. El aparato se fija con cuatro tornos a un bloque macizo de hormigón (de 60 × 60 × 60 cm) de forma que los raíles de guía sean absolutamente verticales y el peso caiga en caída libre. Pueden utilizarse pesos de 5 y 10 kg, de acero macizo. La cabeza de choque de cada peso está hecha de acero templado HRC 60 a 63 y tiene un diámetro mínimo de 25 mm.

La muestra problema se pone en un dispositivo de choque, formado por dos cilindros coaxiales de acero macizo, uno encima del otro, en un anillo de guía de acero en forma de cilindro hueco. Los cilindros de acero macizo deben tener 10 (-0,003, - 0,005) mm de diámetro y 10 mm de altura, sus superficies deben estar pulidas, los bordes redondeados (0,5 mm de radio de curvatura) y su dureza debe ser de HRC 58 a 65. El cilindro hueco debe tener 16 mm de diámetro exterior, un orificio pulido de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm y 13 mm de altura. El dispositivo de choque se monta sobre un yunque intermedio (26 mm de diámetro y 26 mm de altura) hecho de acero y centrado por un anillo con perforaciones que dejen escapar los humos.

1.6.2.2. *Condiciones de ensayo*

El volumen de muestra debe ser de 40 mm^3, o bien un volumen adecuado para otro tipo de aparato alternativo. Las sustancias sólidas deben someterse a ensayo en estado seco y prepararse de la forma siguiente:

a) las sustancias en polvo se pasan por tamiz de 0,5 mm; para las pruebas se usa la fracción que haya atravesado el tamiz;

b) las sustancias prensadas, fundidas o condensadas de alguna otra forma se trituran en fragmentos pequeños y se tamizan; la fracción de diámetro comprendido entre 0,5 y 1 mm es la que se utiliza para los ensayos y debe ser representativa de la sustancia original.

Las sustancias normalmente suministradas como pastas se someterán a ensayos en el estado más seco posible o en algún caso, suprimiendo al máximo posible la cantidad de diluyente. Las sustancias líquidas se estudiarán dejando una separación de 1 mm entre el cilindro de acero superior y el inferior.

▼B

1.6.2.3. *Desarrollo de los ensayos*

Se ejecuta una serie de seis ensayos dejando caer la masa de 10 kg desde la altura de 0,40 m (40 J). Si se obtiene alguna explosión en esta serie de 40 J, hay que realizar otra serie de seis ensayos, dejando caer la masa de 5 kg desde la altura de 0,15 m (7,5 J). En otros equipos, se compara la muestra con la sustancia de referencia elegida según un procedimiento establecido (por ejemplo, técnica de subida y bajada, etc.).

1.6.2.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión (una inflamación y/o una detonación es equivalente a una explosión) al menos una vez en cualquiera de los ensayos con el equipo de choque especificado o si la muestra es más sensible que el 1,3-dinitrobenceno o el RDX en un ensayo de choque alternativo.

1.6.3. **Sensibilidad mecánica (fricción)**

1.6.3.1. *Equipo (figura 5)*

El equipo para el ensayo de fricción consiste en una base de acero fundido sobre la que se monta el dispositivo de fricción. Este consiste en una espiga fija de porcelana y un plato de porcelana móvil. El plato de porcelana se fija a una corredera que se desplaza sobre dos rieles. La corredera se conecta a un motor eléctrico por medio de una barra de conexión, una leva y un engranaje de transmisión adecuado, de forma que el plato de porcelana se desplace una sola vez hacia atrás y hacia adelante por debajo de la espiga de porcelana a lo largo de 10 mm. La espiga de porcelana puede cargarse, por ejemplo, con 120 o 360 N.

Los platos planos de porcelana están hechos de porcelana técnica blanca (rugosidad entre 9 y 32 μm) y sus dimensiones son 25 mm de longitud, 25 mm de anchura y 5 mm de altura. La espiga cilíndrica de porcelana también es de porcelana técnica blanca, mide 15 mm de longitud y 10 mm de diámetro y sus superficies extremas son esféricas y rugosas, con un radio de curvatura de 10 mm.

1.6.3.2. *Condiciones de los ensayos*

El volumen de la muestra debe ser de 10 mm^3, o bien un volumen adecuado para otro tipo de aparato alternativo.

Las sustancias sólidas se someten a ensayo en estado seco y se preparan de la forma siguiente:

a) las sustancias en polvo se pasan por tamiz de 0,5 mm; para las pruebas se utiliza toda la fracción que haya atravesado el tamiz;

b) las sustancias prensadas, fundidas o condensadas de alguna otra forma se trituran en fragmentos pequeños y se tamizan; para los ensayos se utiliza la fracción de diámetro inferior a 0,5 mm.

Las sustancias normalmente suministradas como pastas se someterán a ensayos en el estado más seco posible. Si la sustancia no puede ser preparada en estado seco, la pasta (suprimiendo al máximo posible la cantidad de diluyente) es sometida a ensayo en forma de película de 0,5 mm de espesor, 2 mm de anchura y 10 mm de longitud, preparada con una plantilla.

▼B

1.6.3.3. *Desarrollo de los ensayos*

Se pone sobre la muestra la espiga de porcelana y se aplica la carga. Al realizar el ensayo, las marcas esponjosas del plato de porcelana deben ser transversales a la dirección del movimiento. Hay que vigilar para que la espiga se apoye en la muestra, que haya bastante sustancia problema bajo la espiga y que el plato se mueva correctamente bajo la espiga. En el caso de sustancias pastosas, para aplicar la sustancia al plato se utiliza un dosificador de 0,5 mm de espesor con una ranura de 2 × 10 mm. El plato de porcelana tiene que desplazarse 10 mm hacia adelante y hacia atrás bajo la espiga en el plazo de 0,44 segundos. Cada parte de la superficie del plato y de la espiga debe utilizarse solo una vez; los dos extremos de cada espiga sirven para dos ensayos y cada una de las dos superficies de un plato sirve para tres ensayos.

Se ejecuta una serie de seis pruebas con una carga de 360 N. Si se obtiene algún resultado positivo durante estas seis pruebas, hay que realizar otra serie de seis pruebas con una carga de 120 N. En otros equipos, se compara la muestra con la sustancia de referencia elegida mediante un procedimiento establecido (por ejemplo, técnica de subida y bajada, etc.).

1.6.3.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión (una crepitación y/o una detonación o una inflamación equivale a una explosión) al menos una vez en cualquiera de las pruebas con el equipo especificado de fricción o si se satisfacen los criterios equivalentes de otro ensayo alternativo de fricción.

2. **RESULTADOS**

En principio, se considera que una sustancia presenta peligro de explosión en el sentido de la Directiva si se obtiene un resultado positivo en el ensayo de sensibilidad térmica, al choque o a la fricción.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— forma física de la muestra y si se ha triturado, fragmentado o tamizado,

— observaciones durante los ensayos de sensibilidad térmica (por ejemplo, masa de la muestra, número de fragmentos, etc.),

— observaciones durante los ensayos de sensibilidad mecánica (por ejemplo, formación de cantidades considerables de humo o descomposición completa sin detonación, llamas, chispas, crepitación, etc.),

— resultado de cada tipo de ensayo,

— si se ha utilizado otro aparato alternativo, hay que indicar la justificación científica de dicha utilización, así como las pruebas de correlación entre los resultados obtenidos con el aparato especificado y los obtenidos con aparatos equivalentes,

▼B

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

— cualquier otra observación importante para la interpretación de los resultados.

3.2. INTERPRETACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

El informe debe indicar los resultados que se consideren erróneos, anormales o no representativos. Cuando se rechace un resultado, se facilitará una explicación y se indicarán los resultados del ensayo sustitutivo o complementario. Si un resultado anormal no pudiera explicarse, se deberá aceptar el valor obtenido y se utilizará para clasificar la sustancia en consecuencia.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, Londres, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. y Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 y 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Apéndice

Ejemplo de especificación de material para el ensayo de sensibilidad térmica (véase DIN 1623)

(1) Tubo: especificación de material nº 1.0336.505 g

(2) Placa horadada: especificación de material nº 1.4873

(3) Tuerca y abrazadera de rosca: especificación de material nº 1.3817

Figura 1

Equipo para el ensayo de sensibilidad térmica

(dimensiones en milímetros)

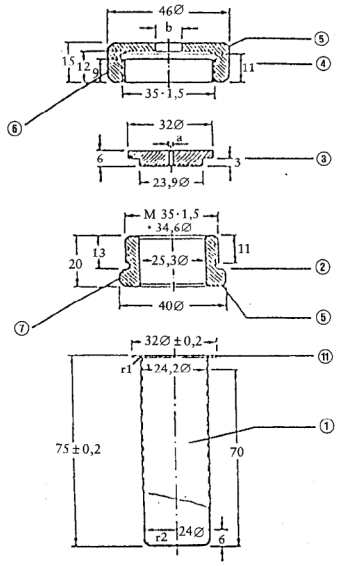


Figura 1a Tubo de acero y accesorios

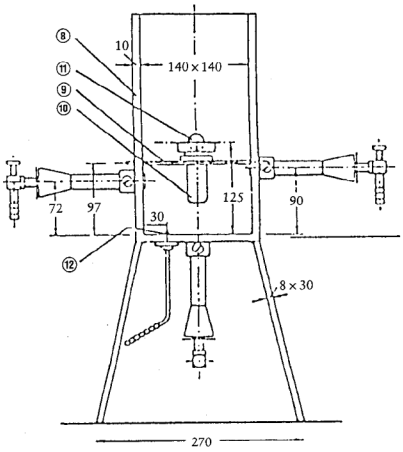


Figura 1b Instrumento de calefacción y protección

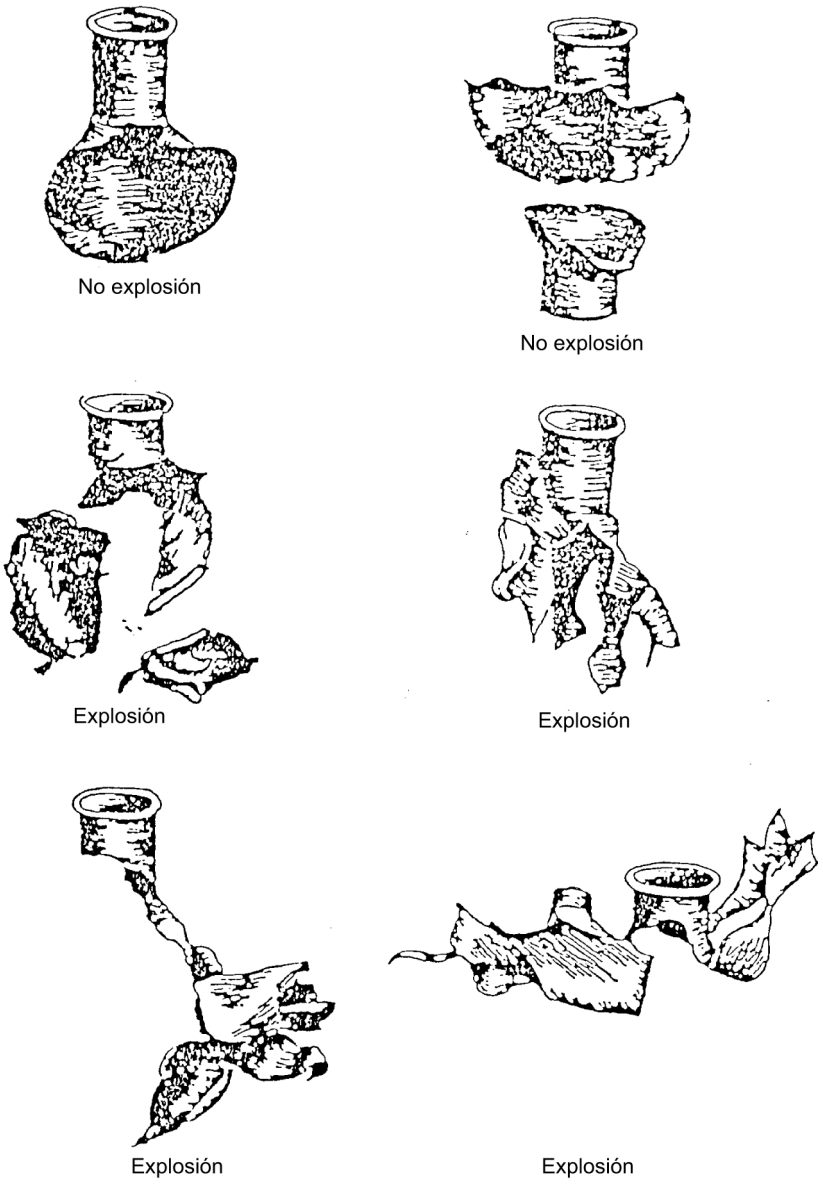
1 = Tubo
1a = Reborde
2 = Abrazadera de rosca; rosca de baja fricción
3 = Placa horadada a = 2,0 o 6,0 mm de diámetro
4 = Tuerca b = 10 mm de diámetro
5 = Chaflán
6 = Dos bateas para llave del 41
7 = Dos bateas por llave del 36
8 = Recinto inastillable
9 = Dos barras para sujetar el tubo
10 = Tubo montado
11 = Posición del mechero trasero, los otros mecheros son visibles en la figura
12 = Llama piloto

▼B

Figura 2

Ensayo de sensibilidad térmica

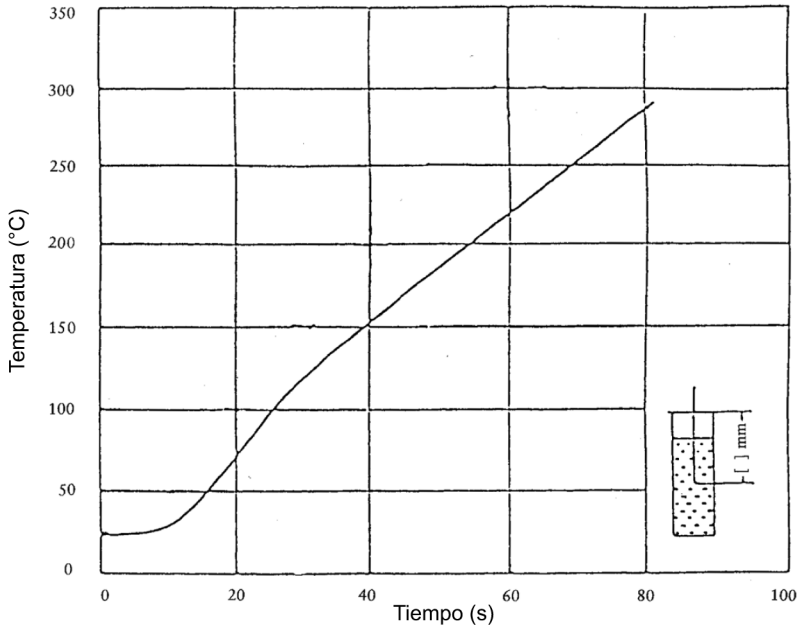
Ejemplos de fragmentación



▼B

Figura 3

Calibración de la velocidad de calentamiento en el ensayo de sensibilidad térmica



Curva temperatura/tiempo obtenida al calentar ftalato de dibutilo (27 cm^3) en un tubo cerrado (placa con orificio de 1,5 mm) utilizando un caudal de propano de 3,2 l/min. La temperatura se mide con un termopar de 1 mm de diámetro de alumel/cromel revestido de acero inoxidable, situado en el centro a 43 mm por debajo del borde del tubo. La velocidad de calentamiento entre 135 ºC y 285 ºC debe estar entre 185 y 215 K/min.

▼B

Figura 4

Equipo del ensayo de choque

(dimensiones en milímetros)

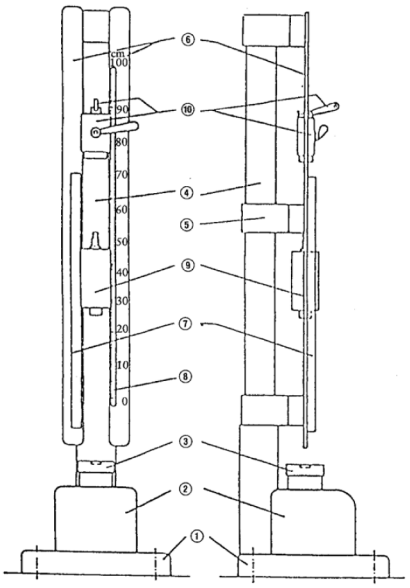


Figura 4a Martinete, vista general frontal y lateral

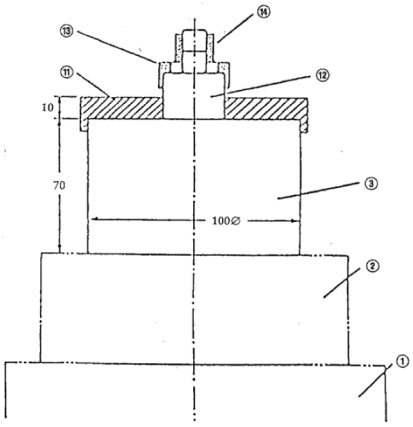


Figura 4b Martinete, parte inferior

1 = Base, 450 x 450 x 60
2 = Bloque de acero 230 x 250 x 200
3 = Yunque, 100 diámetro x 70
4 = Columna
5 = Travesaño medio
6 = 2 raíles
7 = Soporte dentado
8 = Escala graduada
9 = Martinete (masa que cae)
10 = Instrumento de sujeción y liberación
11 = Placa de sujeción
12 = Yunque intermedio (intercambiable), 26 diámetro x 26
13 = Anillo de sujeción con orificios
14 = Dispositivo de choque

▼B

Figura 4

Continuación

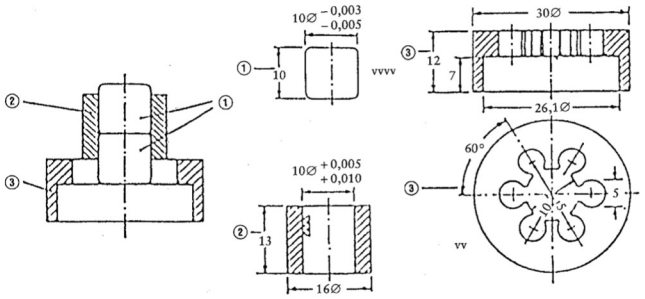
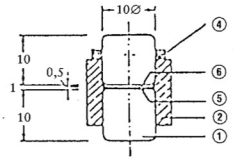


Figura 4c Dispositivo de choque para sustancias en polvo o pastosas

Figura 4d Dispositivo de choque para sustancias líquidas

1 = Cilindros de acero
2 = Anillo de guía para los cilindros de acero
a) sección vertical
b) planta
4 = Arandela de caucho
5 = Sustancia líquida (40 mm^3)
6 = Espacio libre de líquido



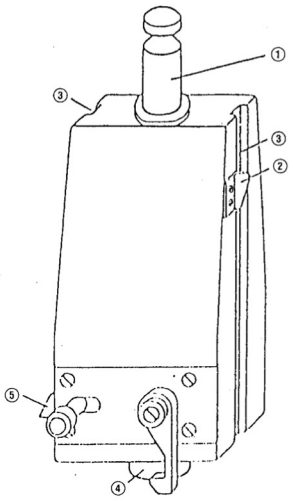


Figura 4e Martillo (masa de 5 kg)

1 = Espiga de suspensión
2 = Marcador de altura
3 = Ranura de colocación
4 = Cabeza cilíndrica de choque
5 = Pestillo contra el rebote

▼B

Figura 5

Equipo de sensibilidad a la fricción

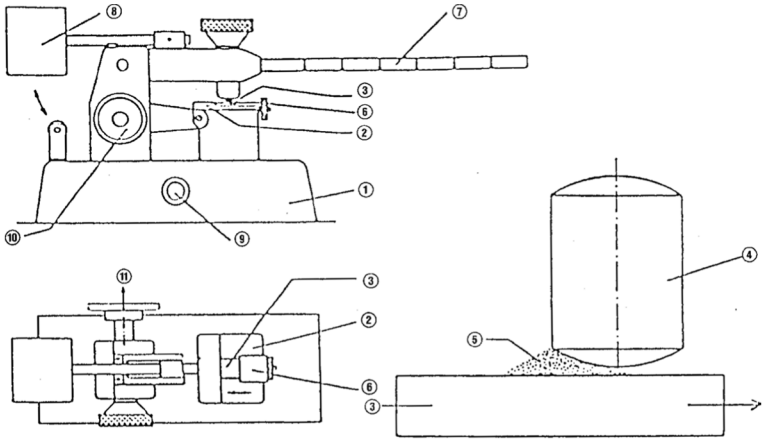


Figura 5a Equipo de fricción: vista de frente y planta

1 = Base de acero
2 = Corredera móvil
3 = Plato de porcelana, 25 X 25 x 5 mm, sujeto a la corredera
4 = Espiga fija de porcelana 10 diámetro X 15 mm
5 = Muestra problema, unos 10 mm^3

Figura 5b Posición inicial de la espiga sobre la muestra

6 = Soporte de la espiga
7 = Brazo de carga
8 = Contrapeso
9 = Interruptor
10 = Rueda para situar la corredera en la posición inicial
11 = Al motor eléctrico

▼B

A.15. TEMPERATURA DE AUTOINFLAMACIÓN (LÍQUIDOS Y GASES)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

No deben someterse a este ensayo las sustancias explosivas ni las que empiecen a arder espontáneamente en contacto con el aire a temperatura ambiente. El procedimiento de ensayo es aplicable a gases, líquidos y vapores que, en presencia de aire, puedan inflamarse por el contacto con una superficie caliente.

La temperatura de autoinflamación puede reducirse considerablemente por la presencia de impurezas catalíticas, por el material de la superficie o por un mayor volumen del recipiente de ensayo.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

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

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Las sustancias de referencia se citan en las normas (véase el punto 1.6.3). Sirven fundamentalmente para comprobar las características del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método determina la temperatura mínima de la superficie interna de un recinto que provoca la inflamación de un gas, vapor o líquido inyectado en el recinto.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad varía según el intervalo de temperatura de autoinflamación y el método de ensayo utilizado.

La sensibilidad y la especificidad dependen del método de ensayo utilizado.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

El equipo se describe en el método que se indica en el punto 1.6.3.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

Se somete a ensayo una muestra de la sustancia problema según el método indicado en el punto 1.6.3.

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

Véanse las normas CEI-79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056 y NF T 20-037.

▼B

2. **RESULTADOS**

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

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

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

— cantidad de muestra utilizada, presión atmosférica,

— equipo utilizado,

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

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

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ninguna.

▼B

A.16. TEMPERATURA RELATIVA DE AUTOINFLAMACIÓN DE SÓLIDOS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

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

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

Si el calor producido, bien por reacción de la sustancia con el oxígeno o bien por descomposición exotérmica, no se disipa con la suficiente rapidez en el ambiente, el autocalentamiento ocasiona la autoinflamación. La autoinflamación se produce, en consecuencia, cuando la velocidad de producción de calor sobrepasa la velocidad de disipación.

El procedimiento es útil como ensayo de selección preliminar para las sustancias sólidas. Teniendo en cuenta la naturaleza compleja de la inflamación y de la combustión de los sólidos, la temperatura de autoinflamación determinada según este método solo debe servir para hacer comparaciones.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

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

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se coloca un volumen definido de la sustancia problema en un horno a temperatura ambiente; se registra la curva de temperatura en el centro de la muestra frente al tiempo, elevando la temperatura del horno hasta 400 ºC o hasta el punto de fusión, si este es menor, a razón de 0,5 ºC por minuto. La temperatura del horno a la que la temperatura de la muestra alcanza los 400 ºC por autocalentamiento es la que, a fines del presente ensayo, se denomina temperatura de autoinflamación.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

1.6.1.1. *Horno*

Horno de laboratorio con temperatura programable (volumen: unos 2 litros) equipado con circulación natural de aire y una válvula de explosión. Se debe evitar que los gases de descomposición entren en contacto con las resistencias eléctricas para evitar cualquier peligro de explosión.

▼B

1.6.1.2. *Cubo de tela de alambre*

Siguiendo el modelo de la figura 1, se corta un pedazo de tela metálica de acero inoxidable con abertura de 0,045 mm. Se dobla la tela metálica y se sujeta con alambre para formar un cubo abierto por la parte superior.

1.6.1.3. *Termopares*

Termopares apropiados.

1.6.1.4. *Registro*

Cualquier registro de dos canales, calibrado en el intervalo de 0 a 600 ºC o a una tensión correspondiente.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

El ensayo se efectúa con las sustancias tal y como se reciben.

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

Se llena el cubo con la sustancia problema, se comprime con cuidado y se añade más sustancia hasta llenar por completo el cubo. Se suspende este en el centro del horno a temperatura ambiente. Se coloca un termopar en el centro del cubo y otro entre el cubo y la pared del horno para registrar la temperatura de este último.

Las temperaturas del horno y de la muestra se registran continuamente elevando la temperatura del horno hasta los 400 ºC o hasta el punto de fusión del sólido, si este valor es menor, a razón de 0,5 ºC por minuto.

Cuando la sustancia se inflame, el termopar colocado en la muestra indicará una subida muy fuerte de la temperatura por encima de la temperatura del horno.

2. **RESULTADOS**

La temperatura del horno a la que la temperatura de la muestra alcanza los 400 ºC por autocalentamiento es significativa para la evaluación (véase la figura 2).

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— descripción de la sustancia problema,

— resultados de las medidas, incluida la curva de temperatura-tiempo,

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

4. **BIBLIOGRAFÍA**

NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperatura of the spontaneous flammability of solids.

▼B

Figura 1

Modelo de cubo de ensayo de 20 mm

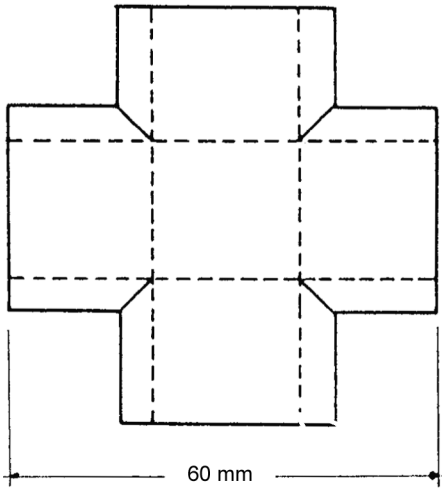
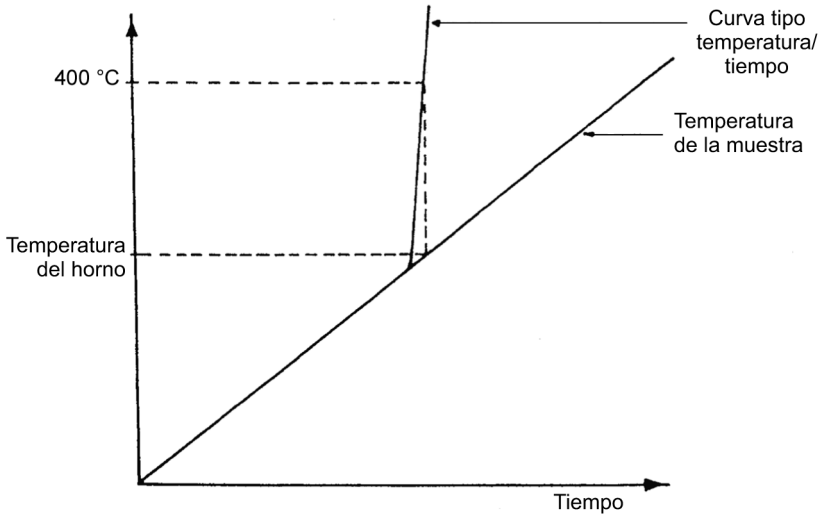


Figura 2

Curva tipo temperatura/tiempo



▼B

A.17. PROPIEDADES COMBURANTES (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de información previa sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Este ensayo no es aplicable a líquidos, gases, sustancias explosivas o fácilmente inflamables ni a los peróxidos orgánicos.

Este ensayo es innecesario cuando el examen de la estructura química ponga de manifiesto que la sustancia no puede dar reacción exotérmica con un combustible.

Para saber si en este ensayo hay que tomar precauciones especiales, debe efectuarse una prueba preliminar.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo de combustión: tiempo de reacción, expresado en segundos, necesario para que la zona de reacción se propague a través de la pila, según el procedimiento descrito en el punto 1.6.

Velocidad de combustión: expresada en milímetros por segundo.

Velocidad máxima de combustión: el valor más elevado entre las velocidades de combustión obtenidas con mezclas que contengan desde un 10 a un 90 % en peso de oxidante.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como sustancia de referencia se utiliza nitrato de bario (de grado analítico) tanto para el ensayo como para el ensayo preliminar.

La mezcla de referencia es la mezcla compuesta por nitrato de bario y celulosa en polvo, preparada según lo indicado en el punto 1.6, que tiene la velocidad máxima de combustión (se trata, generalmente, de una muestra con un 60 % en peso de nitrato de bario).

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Por razones de seguridad se procede a un ensayo preliminar. Este ensayo será, por sí solo, suficiente si durante el mismo se observa claramente que la sustancia problema tiene propiedades comburantes. En caso contrario, la sustancia deberá someterse al ensayo completo.

Para efectuar este ensayo completo se mezclan en proporciones variables la sustancia problema y un combustible definido. Con cada una de las mezclas se forma una pila y esta se enciende por un extremo. La velocidad máxima de combustión observada se compara con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

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

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

1.6.1.1. *Sustancia problema*

Con el fin de obtener una granulometría inferior a 0,125 mm, se somete la muestra al siguiente procedimiento: se tamiza, se tritura la parte que quede y se tamiza de nuevo, repitiendo la operación hasta que toda la muestra haya pasado por el tamiz.

Para triturar y tamizar puede utilizarse cualquier método, siempre que se cumplan los criterios de calidad requeridos.

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

1.6.1.2. *Combustible*

El combustible es celulosa en polvo, del tipo utilizado en cromatografía en capa fina y en columna. Se considera adecuada una celulosa en la que la longitud de más del 85 % de las fibras esté comprendida entre 0,020 y 0,075 mm. El polvo de celulosa se tamiza con una malla de 0,125 mm. Hay que usar el mismo lote de celulosa en todo el ensayo.

Antes de preparar la mezcla, hay que secar la celulosa a 105 ºC hasta obtener el peso constante.

Si en el ensayo preliminar se utiliza serrín, se elegirá un serrín de madera blanda, que se pasará por un tamiz de 1,6 mm de malla, se mezclará bien y se secará a 105 ºC durante 4 horas en capas de no más de 25 mm de espesor. Una vez enfriado, se debe guardar en un envase hermético, llenándolo lo más posible. Es preferible utilizar el serrín dentro de las 24 horas siguientes al secado.

1.6.1.3. *Fuente de ignición*

Debe utilizarse la llama fuerte de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm). Si se utiliza otra fuente de ignición (por ejemplo, si se hace el ensayo en atmósfera inerte) hay que dar su descripción y justificación.

1.6.2. **Desarrollo del ensayo**

Nota:

Las mezclas de comburante con celulosa o serrín deben considerarse potencialmente explosivas y tratarse con las debidas precauciones.

1.6.2.1. *Ensayo preliminar*

La sustancia secada se mezcla bien con celulosa o serrín seco, en una proporción en peso de 2 partes de sustancia problema por 1 parte de celulosa o serrín. Con la mezcla se forma una pila cónica de 3,5 cm de diámetro de base y 2,5 cm de altura, llenando sin comprimir un molde cónico (por ejemplo, un embudo de laboratorio de cristal con el vástago tapado).

▼B

La pila se coloca sobre una superficie fría, incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica. El ensayo debe realizarse bajo una campana extractora (véase el punto 1.6.2.2).

La fuente de ignición se pone en contacto con el cono. Se observan y se anotan la intensidad y la duración de la reacción resultante.

Si la reacción es intensa, se considerará que la sustancia es comburante.

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

1.6.2.2. *Ensayo completo*

Se preparan mezclas de comburante y de celulosa que contengan de un 10 a un 90 % en peso de comburante, en incrementos del 10 %. Para los casos límite, hay que utilizar mezclas intermedias de comburante y celulosa para determinar la velocidad máxima de combustión con más precisión.

Se forma la pila con ayuda de un molde metálico de sección triangular de 250 mm de longitud, 10 mm de altura interior y 20 mm de anchura interior. A ambos lados de este molde se colocan en sentido longitudinal dos placas metálicas puestas como topes laterales que sobrepasen en 2 mm el borde superior de la sección triangular (véase la figura). Este montaje se llena, sin apretar, con un ligero exceso de mezcla. Después de haber dejado caer una vez el molde desde una altura de 2 cm sobre una superficie dura, se elimina la materia sobrante por medio de una lámina sostenida oblicuamente. Se quitan entonces los topes laterales y se aplana la superficie del polvo con ayuda de un rodillo. Se pone entonces sobre el molde una placa incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica, se da la vuelta al conjunto y se quita el molde.

Se pone la pila en el tiro de una campana de gases.

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

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

Se enciende un extremo de la pila aplicándole la llama.

Se mide el tiempo de reacción sobre 200 mm después de que la zona de reacción haya recorrido una distancia inicial de 30 mm.

El ensayo se realiza con la sustancia de referencia y, por lo menos una vez, con cada una de las mezclas de sustancia problema con celulosa.

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

▼B

Si se sospecha que el resultado es un falso positivo, hay que repetir el ensayo con una sustancia inerte que presente un tamaño de partícula similar, como el kieselguhr, en lugar de la celulosa. Otra posibilidad es someter a ensayo en atmósfera inerte (< 2 % v/v de oxígeno) la mezcla sustancia problema/celulosa que haya dado la mayor velocidad de combustión.

2. **RESULTADOS**

Por razones de seguridad, la velocidad máxima de combustión, en lugar de la media, será considerada como la propiedad comburante característica de la sustancia examinada.

En la evaluación se tendrá en cuenta la velocidad de combustión más elevada medida en una serie de seis ensayos con una mezcla dada.

Se representa gráficamente la velocidad de combustión más elevada de cada mezcla en función del contenido en comburante. La velocidad máxima de combustión se obtiene a partir de la gráfica.

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

Se compara la velocidad máxima de combustión obtenida con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia (véase el punto 1.3).

Si se hacen ensayos en atmósfera inerte, se comparará la velocidad máxima de reacción con la de la mezcla de referencia en atmósfera inerte.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— identidad, composición, pureza, humedad, etc., de la sustancia problema,

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

— fuente de ignición utilizada en los ensayos,

— resultados de las medidas,

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

— cualquier otra observación que resulte de utilidad para la interpretación de los resultados, incluida una descripción de la intensidad (llama, chispa, humo, combustión lenta sin llama, etc.) y la duración aproximada de la reacción observada durante el ensayo preliminar de seguridad/selección para la sustancia problema y la sustancia de referencia,

— resultado de los ensayos con una sustancia inerte, en su caso,

— resultado de los ensayos en atmósfera inerte, en su caso.

▼B

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considerará que una sustancia es comburante si:

a) hay una reacción intensa en el ensayo preliminar;

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

A fin de evitar los falsos positivos, a la hora de interpretar los resultados también habrá que tener en cuenta los valores obtenidos al estudiar la sustancia problema mezclada con material inerte o en atmósfera inerte.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

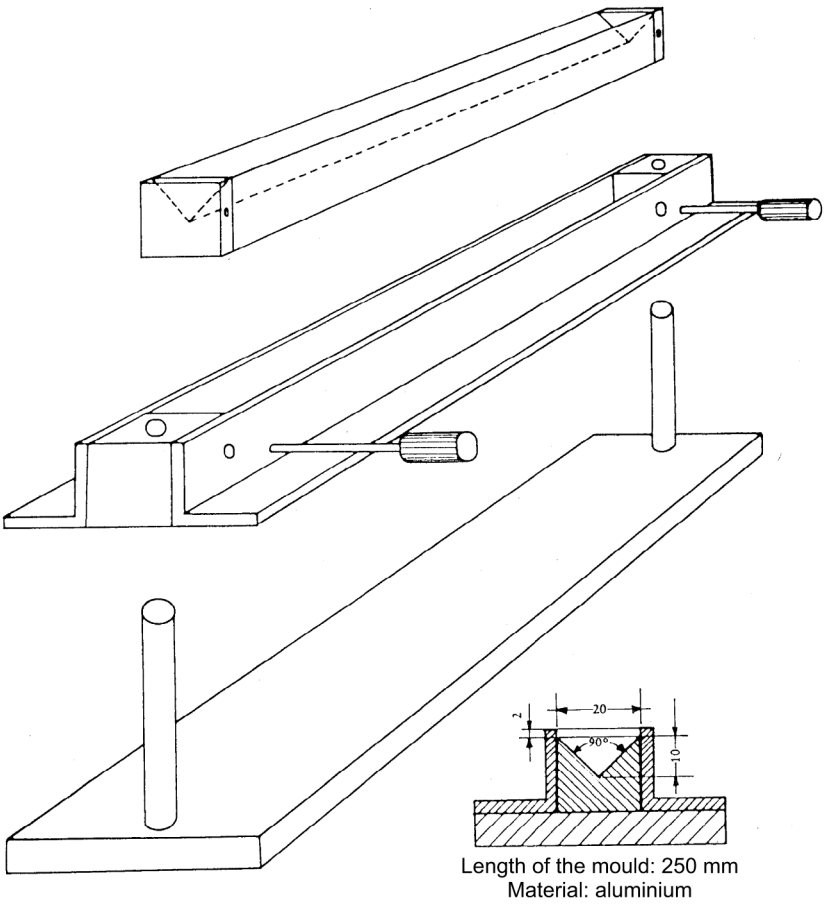
▼B

Apéndice

Figura

Molde y accesorios necesarios para formar las pilas

(rodas las dimensiones expresadas en milímetros)



▼B

A.18. PESO MOLECULAR MEDIO EN NÚMERO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LOS POLÍMEROS

1. MÉTODO

Este método de cromatografía de permeación sobre gel (CPG) es copia de las directrices TG 118 de la OCDE (1996). Los principios fundamentales y demás información técnica se dan en la referencia 1.

1.1. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de las propiedades de los polímeros impide describir un único método que fije precisamente las condiciones de separación y de evaluación que cubran todas las eventualidades y particularidades que se producen en la separación de los polímeros. En particular, es frecuente que los polímeros complejos no puedan someterse a la CPG. En este caso, puede determinarse el peso molecular diferentemente (véase el anexo). Deberán entonces indicarse todos los datos y la justificación del método utilizado.

El método descrito aquí se basa en la norma DIN 55672 (1). Se encontrará en esta norma DIN información precisa sobre la manera de llevar a cabo las pruebas y de evaluar los datos. Cuando sea indispensable introducir modificaciones de las condiciones experimentales, estos cambios deberán justificarse. Se podrán utilizar otras normas con las debidas referencias. El método descrito utiliza para la calibración muestras de poliestireno de polidispersidad conocida y puede ser necesario modificarlo para adaptarlo a algunos polímeros como, por ejemplo, los polímeros solubles en el agua o ramificados de cadena larga.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El peso molecular medio en número M_n y el peso molecular medio en peso M_w se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

donde

H_i = el nivel de la señal del detector a partir de la línea de base para el volumen de retención V_i

M_i = el peso molecular de la fracción polimérica de volumen de retención V_i

n = el número de puntos de medición.

La amplitud de la distribución de los pesos moleculares, que caracteriza la dispersidad del sistema, viene dada por la relación M_w/M_n.

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como la CPG es un método relativo, es necesario efectuar una calibración. Para eso, se utilizan normalmente patrones de poliestireno de distribución estrecha y estructura lineal cuyos pesos moleculares medios M_n y M_w se conocen, así como su distribución de pesos moleculares. La curva de calibración solo puede servir para determinar el peso molecular de la muestra desconocida si las condiciones de separación de la muestra y de los patrones se han seleccionado de manera idéntica.

Una relación determinada entre el peso molecular y el volumen de elución solo es válida en las condiciones específicas de una experiencia particular. Estas condiciones son, sobre todo, la temperatura, el disolvente (o la mezcla de disolventes), las condiciones de la cromatografía y la columna o sistema de columnas de separación.

Los pesos moleculares de la muestra, determinados de esta manera, son valores relativos y se describen como «pesos moleculares equivalentes de poliestireno». En otros términos, según las diferencias estructurales y químicas entre la muestra y los patrones, los pesos moleculares pueden más o menos desviarse de los valores absolutos. Si se recurre a otros patrones como, por ejemplo, de políetilenglicol, de polióxido de etileno, de polimetacrilato de metilo, de poliácido acrilico, se explicará esta elección.

I.4. PRINCIPIOS DEL MÉTODO DE ENSAYO

La distribución de pesos moleculares de la muestra y los pesos moleculares medios (M_n, M_w) pueden determinarse por CPG. La CPG es una cromatografía líquida particular en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de sus componentes (2).

La separación se efectúa mientras que la muestra pasa por una columna rellena de un material poroso, normalmente un gel orgánico. Las moléculas pequeñas consiguen penetrar en los poros, mientras que las gruesas quedan excluidas. El recorrido de las moléculas grandes es, pues, más corto y se eluyen antes. Las moléculas de tamaño medio penetran en algunos poros y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen al final.

En una situación ideal, la separación depende completamente del tamaño de las distintas moléculas, pero en la práctica es difícil evitar la interferencia de al menos algunos efectos de absorción. La situación empeora en caso de relleno irregular de la columna o de volúmenes muertos (2).

Se procede a la detección basándose, por ejemplo, en el índice de refracción o en la absorción UV para llegar a una curva de distribución simple. Sin embargo, para precisar sobre la curva valores efectivos de los pesos moleculares, es necesario calibrar la columna haciendo pasar polímeros de peso molecular conocido y, a ser posible, de estructura globalmente idéntica, por ejemplo, diversos patrones de poliestireno. Resulta de manera característica una curva de Gauss, a veces distorsionada por una pequeña cola hacia el lado de los pesos moleculares bajos; el eje vertical indica la cantidad, en peso, de las especies de distintos pesos moleculares eluídas, y el eje horizontal el logaritmo del peso molecular.

▼B

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad (desviación típica relativa: RSD) del volumen de elución deberá sobrepasar el 0,3 %. La repetibilidad requerida del análisis estará garantizada por corrección mediante patrón interno si se evalúa un cromatograma en función del tiempo y no corresponde al criterio previamente mencionado (1). Las polidispersidades dependen de los pesos moleculares de los patrones. En el caso de los patrones de poliestireno, los valores característicos son:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w//M_n < 1{,}20$

(M_p es el peso molecular del patrón en el máximo del pico)

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Preparación de las soluciones patrón de poliestireno**

Se disuelven los patrones de poliestireno mezclándolos cuidadosamente con el eluyente elegido. Se tendrán en cuenta las recomendaciones del fabricante para la preparación de las soluciones.

Las concentraciones de los patrones elegidos dependen de distintos factores como, por ejemplo, el volumen de inyección, la viscosidad de la solución y la sensibilidad del detector analítico. El volumen máximo de inyección debe adaptarse a la longitud de la columna, con el fin de evitar las sobrecargas. Generalmente, los volúmenes inyectados para las separaciones analíticas por CPG en una columna de 30 cm × ~ 7,8 mm se sitúan entre 40 y 100 ul. Es posible utilizar volúmenes mayores, pero no deben sobrepasar los 250 ul. La relación óptima entre el volumen de inyección y la concentración debe determinarse antes de la calibración efectiva de la columna.

1.6.2. **Preparación de la solución de muestra**

En principio, las mismas exigencias se aplican a la preparación de las soluciones de muestras. La muestra se disuelve en un disolvente conveniente como, por ejemplo, tetrahidrofurano (THF), agitando con cuidado. No debe nunca disolverse en baño de ultrasonidos. En caso necesario, la solución de muestra se purifica con un filtro de membrana cuyo tamaño de poro se sitúa entre 0,2 y 2 μm.

Debe señalarse en el informe final la presencia de partículas no disueltas, puesto que puede tratarse de sustancias de elevado peso molecular. Se utilizará un método conveniente para determinar el porcentaje en peso de partículas no disueltas. Las disoluciones se utilizarán en el plazo de 24 horas.

1.6.3. **Equipo**

— Depósito de disolvente.

— Desgasificador (en su caso).

— Bomba.

▼B

— Amortiguador de pulsaciones (en su caso).

— Sistema de inyección.

— Columnas de cromatografía.

— Detector.

— Caudalímetro (en su caso).

— Conjunto de registro-tratamiento de los datos.

— Receptáculo de residuos.

Es necesario garantizar que el sistema de CPG es inerte respecto a los disolventes utilizados (por ejemplo, utilizando capilares de acero para el disolvente THF).

1.6.4. **Sistema de inyección y de distribución del disolvente**

Un volumen definido de la solución de muestra se pasa a la columna con ayuda de un muestreador automático o bien manualmente, en una zona estrictamente definida. La liberación o la depresión manual demasiado rápida del émbolo de la jeringuilla pueden causar modificaciones en la distribución de pesos moleculares observada. El sistema de distribución del disolvente deberá, en la medida de lo posible, estar libre de pulsaciones, y lo ideal es que incluya un amortiguador de pulsaciones. El caudal es del orden de 1 ml/min.

1.6.5. **Columna**

Según la muestra, el polímero se caracterizará con ayuda de una columna simple o de varias columnas conectadas en secuencia. Está disponible en el comercio diverso material para columnas porosas, de propiedades definidas (por ejemplo, tamaño de poro, límites de exclusión). La elección del gel de separación o de la longitud de la columna depende tanto de las propiedades de la muestra (volúmenes hidrodinámicos, distribución de los pesos moleculares) como de las condiciones específicas de la separación, como el disolvente, la temperatura y el caudal (1) (2) (3).

1.6.6. **Platos teóricos**

La columna (o la combinación de columnas) utilizada para la separación debe caracterizarse por el número de platos teóricos. En el caso de tomar el THF como disolvente de elución, es necesario cargar una solución de etilbenceno u otro soluto homopolar adecuado en una columna de longitud conocida. El número de platos teóricos viene dado por la siguiente ecuación:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{o} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

donde

N = número de platos teóricos

V_e = volumen de elución en el máximo del pico

▼B

W = anchura del pico en la línea de base

$W_{1/2}$ = lanchura del pico a la mitad de la altura.

1.6.7. **Capacidad de separación**

Además del número de platos teóricos, cantidad que determina la anchura de la banda, la capacidad de separación desempeña también un papel y está determinada por la pendiente de la curva de calibración. La capacidad de separación de una columna viene dada por la siguiente relación:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{superficie de la secció tranversal de la columna}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

donde

$V_{e,\,Mx}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular M_x

$V_{e(I0Mx)}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular diez veces superior.

La resolución del sistema se define generalmente deí siguiente modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

donde

$V_{el'}\ V_{e1}$ = volúmenes de elución de los dos patrones de poliestireno en el máximo del pico

$W_{1,}\ W_2$ = anchuras de los picos en la línea de base

$M_1,\ M_2$ = pesos moleculares en el máximo del pico (deberían diferir en un factor de 10)

El valor R del sistema de columna debería sobrepasar 1.7 (4),

1.6.8. **Disolvente**

Todos los disolventes deben ser de gran pureza (para el THF, se exigirá una pureza del 99,5 %). El depósito de disolvente (en caso necesario, en una atmósfera de gas inerte) debe ser suficientemente grande para la calibración de la columna y varios análisis de muestras. El disolvente debe desgasificarse antes de su transporte a la columna por la bomba.

1.6.9. **Ajuste de la temperatura**

La temperatura de los componentes internos esenciales (circuito de inyección, columnas, detector y conducciones) será constante y en coherencia con la elección del disolvente.

▼B

1.6.10. **Detector**

El detector tiene por objeto registrar cuantitativamente la concentración de muestra eluida de la columna. Para evitar el ensanchamiento inútil de los picos, el volumen de la célula del detector debe ser lo más bajo posible. No debería exceder de 10 µl excepto en caso de detectores de dispersión de luz y de viscosidad. La detección se hace generalmente por refractometría diferencial. Sin embargo, si alguna propiedad de la muestra o del disolvente de elución lo impone, se puede recurrir a otros tipos de detectores, como por ejemplo, detectores de UV/visible, IR, viscosidad, etc.

2. **RESULTADOS E INFORMES**

2.1. RESULTADOS

Hay que remitirse a la norma DIN (1) respecto al detalle de los criterios de evaluación así como para los imperativos relativos a la recogida y tratamiento de los datos.

De cada muestra, deben realizarse dos experiencias independientes, que será necesaria analizar separadamente.

M_n, M_w, M_w/M_n y M_p deben establecerse en cada medición. Es necesario indicar explícitamente que los valores medidos son valores relativos equivalentes a los pesos moleculares de los patrones utilizados.

Después de la determinación de los volúmenes de retención o del tiempo de retención (eventualmente corregidos con ayuda de un patrón interno), los valores log M_p (M_p es el máximo del pico del patrón de calibración) se representan gráficamente en función de una de esas cantidades. Serán necesarios al menos dos puntos de calibración por década de pesos moleculares y al menos cinco puntos de medida para la curva entera, que debe cubrir el peso molecular estimado de la muestra. El peso molecular más bajo de la curva de calibración se define por-el n-hexilbenceno u otro soluto homopolar adecuado. La media en número y la media en peso de los pesos moleculares se determinan generalmente por tratamiento informático de los datos, sobre la base de las fórmulas del punto 1.2. En caso de digitalización manual, se puede consultar el documento ASTM D 3536-91 (3).

La curva de distribución debe darse en forma de cuadro o de gráfico (frecuencia diferencial o porcentajes de las sumas frente al log M). Para la representación gráfica, una década de pesos moleculares debería normalmente ocupar unos 4 cm de anchura y el máximo del pico debería encontrarse a unos 8 cm de altura. En el caso de curvas de distribución integral, la diferencia de ordenadas entre 0 y 100 % debería ser de cerca de 10 cm.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

2.2.1. **Sustancia de ensayo**

— Información existente sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas).

▼B

— Descripción del tratamiento de la muestra, observaciones, problemas.

2.2.2. **Equipo**

— Depósito de eluyente, gas inerte, desgasificación del eluyente, composición del eluyente, impurezas.

— Bomba, amortiguador de pulsaciones, sistema de inyección.

— Columnas de separación (fabricante, toda la información sobre las características de las columnas como tamaño del poro, naturaleza del material de separación, etc., número, longitud y orden de las columnas utilizadas).

— Número de platos teóricos de la columna (o combinación), capacidad de separación (resolución del sistema).

— Información sobre la simetría de los picos.

— Temperatura de la columna, naturaleza del ajuste de la temperatura.

— Detector (principio de medida, volumen de la célula).

— Caudalímetro si se utiliza (fabricante, principio de medida).

— Sistema de registro y tratamiento de los datos (material y programas informáticos).

2.2.3. **Calibración del sistema**

— Descripción precisa del método empleado para construir la curva de calibración.

— Información sobre los criterios de calidad de este método (por ejemplo, coeficiente de correlación, suma de cuadrados de error, etc.).

— Explicaciones sobre todas las extrapolaciones, hipótesis y aproximaciones hechas durante el procedimiento experimental y la evaluación y tratamiento de los datos.

— Todas las medidas utilizadas para construir la curva de calibración deben precisarse en un cuadro que incluya la información siguiente de cada punto de calibración:

  — nombre de la muestra,

  — fabricante de la muestra,

  — valores característicos de los patrones M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, proporcionados por el fabricante o derivados de medidas posteriores, junto con precisiones sobre el método de determinación,

  — volumen y concentración de inyección,

▼B

— valor de M_p utilizado para la calibración,

— volumen de elución o tiempo de retención corregido medido en los máximos de los picos

— M_p calculado en el máximo de los picos,

— error porcentual del M_p calculado y del valor de calibración.

2.2.4. **Evaluación**

— Evaluación en función del tiempo: métodos utilizados para garantizar la reproducibilidad requerida (método de corrección, patrón interno, etc.).

— Información sobre si la evaluación se ha realizado basándose en el volumen de elución o en el tiempo de retención.

— Información sobre los límites de la evaluación si no se analiza completamente un pico.

— Descripción de los métodos de suavizado, si se utilizan.

— Procedimientos de preparación y de tratamiento preliminar de la muestra.

— Posible presencia de partículas no disueltas.

— Volumen de inyección (µl) y concentración de inyección (mg/ml).

— Observaciones sobre los efectos que llevan a divergencias en relación con el perfil ideal de la CPG.

— Descripción detallada de todas las modificaciones de los procedimientos de ensayo.

— Precisiones sobre las gamas de errores.

— Toda la información y observaciones pertinentes para la interpretación de los resultados.

3. **REFERENCIAS**

(1) DIN 55672 (1995). *Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrabydrofuran (THE) als Elutionsmittel,* Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). *Modern Size Exclusión Liquid Cbromato- grapby,* J. Wiley and sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Cbromatography-GPC).* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystirene by High Performance Size-Exclusion Chromatography.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Anexo

Ejemplos de otros métodos de determinación del peso molecular promedio en número (M) de los polímeros

La cromatografía por permeación sobre gel (CPG) es el método de elección para determinar M_n, en particular cuando se dispone de un conjunto de patrones que tienen una estructura comparable a la del polímero. Sin embargo, cuando surgen dificultades prácticas en la utilización de la CPG o si se espera por adelantado que la sustancia no cumpla algún criterio M_n reglamentario (y que exija confirmación) existen otros métodos, por ejemplo:

1. **Utilización de las propiedades coligativas**

1.1. Ebulloscopia/crioscopia:

ponen en juego la medida de la subida del punto de ebullición (ebulloscopia) o del descenso del punto de congelación (crioscopia) de un disolvente, cuando se añade el polímero. El método se basa en el hecho de que el efecto del polímero disuelto sobre el punto de ebullición congelación del líquido depende del peso molecular del polímero (1) (2).

Aplicabilidad, $M_n < 20\,000$.

1.2. Descenso de la presión de vapor:

pone en juego la medida de la presión de vapor de un líquido de referencia determinado antes y después de la adición de cantidades conocidas de polímero (1) (2).

Aplicabilidad, $M < 20\,000$ (teóricamente, sin embargo, en la práctica, su valor es limitado).

1.3 Osmometría de membrana:

se basa en el principio de la osmosis, es decir, la tendencia natural de las moléculas de disolvente a atravesar una membrana semipermeable desde una solución diluida hacia una solución concentrada para llegar al equilibrio. En el ensayo, la solución diluida tiene una concentración cero, mientras que la solución concentrada contiene el polímero. El efecto del paso del disolvente a través de la membrana causa un diferencial de presión que depende de la concentración y del peso molecular del polímero (1) (3) (4).

Aplicabilidad, $M_n < 20\,000$ y $200\,000$.

1.4 Osmometría en fase de vapor:

compara la velocidad de evaporación de un aerosol de disolvente puro con al menos tres aerosoles que contiene el polímero a distintas concentraciones (l) (5) (6).

Aplicabilidad, $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Análisis de grupos terminales**

Para utilizar este método, es necesario conocer al mismo tiempo la estructura global del polímero v la naturaleza de los grupos terminales de las cadenas (que debe ser distinguible del esqueleto principal por, por ejemplo, RMN o valoración/derivación). La determinación de la concentración molecular de los grupos terminales presentes en el polímero permite determinar un valor del peso molecular (7) (8)

Aplicabilidad, M_n hasta 50 000 (con fiabilidad decreciente).

3. **referencias**

(1) Billmeyer, F.W. Jr, (1984). *Textbook of Polymer Science,* 3rd Edn, John Viley, Nueva York.

(2) Glover, CA., (1975). «Absolute Colligative Property Methods». Chapter 4 In: *Polymer Molecular Weights,* Part I, P.E. Slade, Jr. ed, Marcel Dekker, Nueva York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). *Standard Practicc for Determination of Number-Average Molecular Wcight of Polymers by Membrane Osnwmetry.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989), «Membrane Osmometry. In: *Determination of Molecular Weight,* A.R. Cooper ed, I. W'iley and Sons. pp. 25-52».

(5) ASTM 3592-77, (19"). *Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure,* American Society íor Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989), «Vapour Pressure Osmometry-. In: *Determination of Molecular Weight,* A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons».

(7) Schröder, E., Müller, G., y Arndt, K-F., (1989). *Polymer Characterisation,* Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). «End-Group Determinations», Chapter 3 In: *Polymer Molecular Weights,* Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, Nueva York.

(9) Amiya, S, *et al.* (1990). *Pure and Applied Chemistry,* 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **CONTENIDO DE SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN LOS POLÍMEROS**

1. **MÉTODO**

Este método de cromatografía de permeación sobre el gel (CPG) es copia de las directrices TG 119 de la OCDE (1996). Los principios fundamentales y demás información técnica se dan en la referencia 1.

1.1. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de las propiedades de los polímeros impide describir un único método que fije precisamente las condiciones de separación y de evaluación que cubran todas las eventualidades y particularidades que se producen en la separación de los polímeros. En particular, es frecuente que los polímeros complejos no puedan someterse a la CPG. En este caso, puede determinarse el peso molecular diferentemente (véase el anexo). Deberán entonces indicarse todos los datos y la justificación del método utilizado.

El método descrito aquí se basa en la norma DIN 55672 (1). Se encontrará en esta norma DIN información precisa sobre la manera de llevar a cabo las pruebas y de evaluar los datos. Cuando sea indispensable introducir modificaciones de las condiciones experimentales, estos cambios deberán justificarse. Se podrán utilizar otras normas con las debidas referencias. El método descrito utiliza para la calibración muestras de poliestireno de polidispersidad conocida y puede ser necesario modificarlo para adaptarlo a algunos polímeros como, por ejemplo, los polímeros solubles en el agua o ramificados de cadena larga.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Un peso molecular bajo se define arbitrariamente como un peso molecular por debajo de 1 000 dalton.

El peso molecular medio en número M_{ti} y el peso molecular medio en peso M_w se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

donde

H_i = nivel de la señal del detector a partir de la línea de base para el volumen de retención V_i

M_i = peso molecular de la fracción polimérica de volumen de retención $V_{i\ y}$ n es el número de puntos de medición.

La amplitud de la distribución de los pesos moleculares, que caracteriza la dispersidad del sistema, viene dada por la relación M_w/M_n.

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como la CPG es un método relativo, es necesario efectuar una calibración. Para eso, se utilizan normalmente patrones de poliestireno de distribución estrecha y estructura lineal cuyos pesos moleculares medios M_n y M_w se conocen, así como su distribución de pesos moleculares. La curva de calibración solo puede servir para determinar el peso molecular de la muestra desconocida si las condiciones de separación de la muestra y de los patrones se han seleccionado de manera idéntica.

Una relación determinada entre el peso molecular y el volumen de elución solo es válida en las condiciones específicas de una experiencia particular. Estas condiciones son, sobre todo, la temperatura, el disolvente (o la mezcla de disolventes), las condiciones de la cromatografía y la columna o sistema de columnas de separación,

Los pesos moleculares de la muestra, determinados de esta manera, son valores relativos y se describen como «pesos moleculares equivalentes de poliestireno». En otros términos, según las diferencias estructurales y químicas entre la muestra y los patrones, los pesos moleculares pueden más o menos desviarse de los valores absolutos. Si se recurre a otros patrones como, por ejemplo, de polietilenglícol, de polióxido de etileno, de polimetacrilato de metilo, de poliácido acrílico, se explicará esta elección.

1.4. PRINCIPIOS DEL MÉTODO DE ENSAYO

La distribución del peso molecular de la muestra y los pesos moleculares medios (M_n y M_w) pueden determinarse por CPG. La CPG es una cromatografía líquida particular en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de sus componentes (2).

La separación se efectúa mientras que la muestra pasa por una columna rellena de un material poroso, normalmente un gel orgánico. Las moléculas pequeñas consiguen penetrar en los poros, mientras que las gruesas quedan excluidas. El recorrido de las moléculas grandes es, pues, más corto y se eluyen antes. Las moléculas de tamaño medio penetran en algunos poros y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen al final,

En una situación ideal, la separación depende completamente del tamaño de las distintas moléculas, pero en la práctica es difícil evitar la interferencia al menos de algunos efectos de absorción. La situación empeora en caso de relleno irregular de la columna o de volúmenes muertos (2).

Se procede a la detección basándose, por ejemplo, en el índice de refracción o en la absorción UV para llegar a una curva de distribución simple. Sin embargo, para precisar sobre la curva valores efectivos de los pesos moleculares, es necesario calibrar la columna haciendo pasar polímeros de peso molecular conocido y, a ser posible, de estructura globalmente idéntica, por ejemplo, diversos patrones de poliestireno. Resulta de manera característica una curva de Gauss, a veces distorsionada por una pequeña cola hacia el lado de los pesos moleculares bajos; el eje vertical indica la cantidad, en peso, de las especies de distintos pesos moleculares eluidas, y el eje horizontal el logaritmo del peso molecular.

▼B

El contenido en sustancias de bajo peso molecular se obtiene de esta curva. El cálculo solo puede ser preciso si las especies de peso molecular bajo responden del mismo modo, en función del peso, que el polímero en su conjunto.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad (desviación típica relativa: RSD) del volumen de elución deberá sobrepasar el 0,3 %. La repetibilidad requerida del análisis estará garantizada por corrección mediante patrón interno si se evalúa un cromatograma en función del tiempo y no corresponde al criterio previamente mencionado (1). Las polidispersidades dependen de los pesos moleculares de los patrones. En el caso de los patrones de poliestireno, ios valores característicos son.

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p es el peso molecular del patrón en el máximo del pico)

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Preparación de las soluciones patrón de poliestireno**

Se disuelven los patrones de poliestireno mezclándolos cuidadosamente con el eluyente elegido. Se tendrán en cuenta las recomendaciones del fabricante para la preparación de las soluciones.

Las concentraciones de los patrones elegidos dependen de distintos factores como, por ejemplo, el volumen de inyección, la viscosidad de la solución y la sensibilidad del detector analítico. El volumen máximo de inyección debe adaptarse a la longitud de la columna, con el fin de evitar las sobrecargas. Generalmente, los volúmenes inyectados para las separaciones analíticas por CPG en una columna de 30 cm × 7,8 mm se sitúan entre 40 y 100 µl. Es posible utilizar volúmenes mayores, pero no deben sobrepasar 250 µl. La relación óptima entre el volumen de inyección y la concentración debe determinarse antes de la calibración efectiva de la columna.

1.6.2. **Preparación de la solución de muestra**

En principio, las mismas exigencias se aplican a la preparación de las soluciones de muestras. La muestra se disuelve en un disolvente conveniente como, por ejemplo, retrahidrofurano (THF), agitando con cuidado. No debe nunca disolverse en baño de ultrasonidos. En caso necesario, la solución de muestra se purifica con un filtro de membrana cuyo tamaño de poro se sitúa entre 0,2 y 2 µm.

Debe señalarse en el informe final la presencia de partículas no disueltas, puesto que puede tratarse de sustancias de elevado peso molecular. Se utilizará un método conveniente para determinar el porcentaje en peso de partículas no disueltas. Las disoluciones se utilizarán en el plazo de 24 horas.

▼B

1.6.3. **Corrección del contenido en impurezas y aditivos**

Es generalmente necesario proceder a una corrección del contenido de las sustancias de M < 1 000 para tener en cuenta la contribución de los componentes específicos no poliméricos presentes (por ejemplo, impurezas o aditivos), salvo si el contenido medido es ya < 1 %. Esto se hace mediante el análisis directo de la solución polimérica o del eluido de la CPG.

Cuando el eluido, después de su paso a través de la columna, está demasiado diluido para el análisis posterior, hay que concentrarlo. Puede ser necesario evaporarlo hasta estado seco para disolverlo de nuevo a continuación. La concentración del eluido debe hacerse en condiciones que garanticen que no sufre ningún cambio. El tratamiento del eluido después de la CPG depende del método analítico utilizado para las determinaciones cuantitativas.

1.6.4. **Equipo**

La CPG exige el siguiente equipo:

— depósito de disolvente,

— desgasificador (en su caso),

— bomba,

— amortiguador de pulsaciones (en su caso),

— sistema de inyección,

— columnas de cromatografía,

— detector,

— caudalímetro (en su caso),

— conjunto de registro-tratamiento de los datos,

— receptáculo de residuos.

Es necesario garantizar que el sistema de CPG es inerte respecto a los disolventes utilizados (por ejemplo, utilizando capilares de acero para el disolvente THF).

1.6.5. **Sistema de inyección y de distribución del disolvente**

Un volumen definido de la solución de muestra se pasa a la columna con ayuda de un muestreador automático o bien manualmente, en una zona estrictamente definida. La liberación o la depresión demasiado rápida del émbolo de la jeringuilla pueden causar modificaciones en la distribución de pesos moleculares observada. El sistema de distribución del disolvente deberá, en la medida de lo posible, estar libre de pulsaciones, y lo ideal es que incluya un amortiguador de pulsaciones. El caudal es del orden de 1 ml/mm.

1.6.6. **Columna**

Según la muestra, el polímero se caracterizará con ayuda de una columna simple o de varias columnas conectadas en secuencia. Está disponible en el comercio diverso material para columnas porosas, de propiedades definidas (por ejemplo, tamaño de poro, límites de exclusión). La elección del gel de separación o de la longitud de la columna depende tanto de las propiedades de la muestra (volúmenes hidrodinámicos, distribución de los pesos moleculares) como de las condiciones específicas de la separación, como disolvente, la temperatura y el caudal (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Platos teóricos**

La columna (o la combinación de columnas) utilizada para la separación debe caracterizarse por el número de platos teóricos. En el caso de tomar el THF como disolvente de elución, es necesario cargar una solución de etilbenceno u otro soluto homopolar adecuado en una columna de longitud conocida. El número de platos teóricos viene dado por la siguiente ecuación:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{o} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

donde

N = número de platos teóricos

V_c = volumen de elución en el máximo del pico

W = anchura del pico en la línea de base

$W_{1/2}$ = anchura del pico a la mitad de la altura.

1.6.8. **Capacidad de separación**

Además del número de platos teóricos, cantidad que determina la anchura de la banda, la capacidad de separación desempeña también un papel y está determinada por la pendiente de la curva de calibración. La capacidad de separación de una columna viene dada por la siguiente relación:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{superficie de la secció tranversal de la columna}} \geq 6,0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

donde

$V_{e,\,Mx}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular diez veces superior.

La resolución del sistema se define generalmente del siguiente modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

donde

$V_{e1}\ V_{e2}$ = volúmenes de elución de los dos patrones de poliestireno en el máximo del pico

$W_1\ W_2$ = anchuras de los picos en la línea de base

$M_1, M_2,$ = pesos moleculares en el máximo del pico (deberán diferir en un factor de 10)

El valor R del sistema de columna debería sobrepasar 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Disolvente**

Todos los disolventes deben ser de gran pureza (para el THF, se exigirá una pureza del 99,5 %). El depósito de disolvente (en caso necesario, en una atmósfera de gas inerte) debe ser suficientemente grande para la calibración de la columna y varios análisis de muestras. El disolvente debe desgasificarse antes de su transporte a la columna por la bomba.

1.6.10. **Ajuste de la temperatura**

La temperatura de los componentes internos esenciales (circuito de inyección, columnas, detector y conducciones) será constante y en coherencia con la elección del disolvente.

1.6.11. **Detector**

De detector tiene por objeto registrar cuantitativamente la concentración de muestra eluida de la columna. Para evitar el ensanchamiento inútil de los picos, el volumen de la célula deí detector debe ser lo más bajo posible. No debería exceder de 10 µl excepto en caso de detectores de dispersión de luz y de viscosidad. La detección se hace generalmente por refractometría diferencial. Sin embargo, si alguna propiedad de la muestra o del disolvente de elución lo impone, se puede recurrir a otros tipos de detectores, como por ejemplo, detectores de UV/visible, IR, viscosidad, etc.

2. **RESULTADOS E INFORMES**

2.1. DATOS

Hay que remitirse a la norma DIN (1) respecto al detalle de los criterios de evaluación así como para los imperativos relativos a la recogida y tratamiento de los datos.

De cada muestra deben realizarse dos experiencias independientes, que se analizaran separadamente. En todos los casos, es absolutamente necesario determinar también los datos procedentes de controles tratados en las mismas condiciones que la muestra.

Es necesario indicar explícitamente que los valores medidos son valores relativos equivalentes a los pesos moleculares del patrón utilizado.

Después de la determinación de los volúmenes de retención o del tiempo de retención (eventualmente corregidos con ayuda de un patrón interno), los valores log M_p (M_p es el máximo del pico del patrón de calibración) se representan gráficamente en función de una de estas cantidades. Son necesarios al menos dos puntos de calibración por década de pesos moleculares y cinco puntos de medida al menos para la curva entera, que debe cubrir el peso molecular estimado de la muestra. El peso molecular más bajo de la curva de calibración se define con n-hexilbenceno u otro soluto homopolar adecuado. La porción de la curva que corresponde a los pesos moleculares inferiores a 1 000 se determina y se corrige según sea necesario en función de las impurezas y aditivos. Las curvas de elución se evalúan generalmente por tratamiento informático de los datos. Si se procede a una digitalización manual, se puede consultar el documento ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Si se retiene cualquier polímero insoluble en la columna, su peso molecular será probablemente superior al de la fracción soluble y. si no se tiene en cuenta, conducirá a sohrestimar el contenido en pesos moleculares bajos. El anexo propone principios de corrección del contenido en pesos moleculares bajos en función de los polímeros insolubles.

La curva de distribución debe darse en forma de cuadro o de gráfico (frecuencia diferencial o porcentajes de las sumas frente al log M). Para la representación gráfica, una década de pesos moleculares debería normalmente ocupar unos 4 cm de anchura y el máximo del pico debería encontrarse a unos 8 cm de altura. En el caso de curvas de distribución integral, la diferencia de ordenadas entre 0 y 100 % debería ser de cerca de 10 cm.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

2.2.1. **Sustancia de ensayo**

— información disponible sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas),

— descripción del tratamiento de la muestra, observaciones, problemas.

2.2.2. **Equipo**

— Depósito de eluyente, gas inerte, desgasificación del eluyente, composición del eluyente, impurezas.

— Bomba, amortiguador de pulsaciones, sistema de inyección.

— Columnas de separación (fabricante, toda la información sobre las características de las columnas como tamaño del poro, naturaleza del material de separación, etc., número, longitud y orden de las columnas utilizadas).

— Número de platos teóricos de la columna (o combinación), capacidad de separación (resolución del sistema).

— Información sobre la simetría de los picos.

— Temperatura de la columna, naturaleza del ajuste de la temperatura.

— Detector (principio de medida, volumen de la célula).

— Caudalímetro si se utiliza (fabricante, principio de medida).

— Sistema de registro y tratamiento de los datos (material y programas informáticos).

2.2.3. **Calibración del sistema**

— Descripción precisa del método empleado para construir la curva de calibración.

▼B

— Información sobre los criterios de calidad de este método (por ejemplo, coeficiente de correlación, suma de los cuadrados de los errores, etc.).

— Explicaciones sobre todas las extrapolaciones, hipótesis y aproximaciones hechas durante el procedimiento experimental y la evaluación y tratamiento de los datos.

— Todas las medidas utilizadas para construir la curva de calibración deben precisarse en un cuadro que incluya la información siguiente de cada punto de calibración:

  — nombre de la muestra,

  — fabricante de la muestra,

  — valores característicos de los patrones M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, proporcionados por el fabricante o derivados de medidas posteriores, junto con precisiones sobre el método de determinación,

  — volumen y concentración de inyección,

  — valor de M_p utilizado para la calibración,

  — volumen de elución o tiempo de retención corregido medido en los máximos de los picos,

  — M_p calculado en el máximo del pico,

  — error porcentual del M_p calculado y del valor de calibración.

2.2.4. **Información sobre el contenido en polímeros de bajo peso molecular**

— Descripción del método utilizado para el análisis y manera de llevar las experiencias.

— Información sobre el porcentaje de contenido en especies de bajo peso molecular (p/p) en relación con la muestra total.

— Información sobre las impurezas, aditivos y otras especies no poliméricas en porcentaje en peso en relación con la muestra total.

2.2.5. **Evaluación**

— Evaluación en función del tiempo: métodos utilizados para garantizar la reproducibilidad requerida (método de corrección, patrón interno, etc.).

— Información sobre sí la evaluación se ha realizado basándose en el volumen de elución o en el tiempo de retención.

— Información sobre los límites de la evaluación si no se analiza completamente un pico.

— Descripción de los métodos de suavizado, si se utilizan.

— Procedimientos de preparación y de tratamiento preliminar de la muestra.

— Posible presencia de partículas no disueltas.

▼B

— Volumen de inyección (μl) y concentración de inyección (mg/ml).

— Observaciones sobre los efectos que llevan a divergencias en relación con el perfil ideal de la CPG.

— Descripción detallada de todas las modificaciones de procedimientos de ensayo.

— Precisiones sobre las gamas de errores.

— Toda la información y observaciones pertinentes para la interpretación de los resultados.

3. **REFERENCIAS**

(1) DIN 55672 (19.95) *Gelpermeationschrornatographie (CPG) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel,* Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., y Bly, D.D. eds, (1979). *Modern Size Exclusión Liquid Chromato- graphy,* J. Wiley and sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Cbromatography (Gel Permeation Chromato-grapby-GPC).* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystirene by High Performance Size-Exclusion Chromatography.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Anexo

Orientaciones para la corrección del contenido en bajos pesos moleculares en presencia de polímeros ínsolubles

Cuando está presente en una muestra un polímero insoluble, ocasiona una pérdida de masa durante el análisis por CPG. El polímero insoluble se retiene irreversiblemente en la columna o filtro de la muestra mientras que la porción soluble de la muestra pasa a través de la columna. Cuando puede estimarse o medirse el aumento del índice de refracción (dn/dc) del polímero, se puede estimar la pérdida de masa de la muestra en la columna. En este caso, se procede a una corrección mediante calibración externa con materiales patrón de concentraciones y dn/dc conocidas, para calibrar la respuesta del refractómetro. En el siguiente ejemplo, se utiliza un patrón de poli (metilmetacrilato) (pMMA).

En la calibración externa para el análisis de polímeros acrílicos, se analiza por CPG un patrón de pMMA de concentración conocida en tetrahidrofurano y los datos resultantes sirven para establecer la constante del refractómetro según la ecuación:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

donde:

K = constante del refractómetro (en microvoltios; segundos/ml)

R = respuesta del patrón de pMMA (en microvoltios; segundos)

C = concentración del patrón de pMMA (en mg/ml)

V = volumen de inyección (en ml)

dn/dc = aumento del índice de refracción del pMMA en tetrahidrofurano (en ml/mg).

El patrón de pMMA presenta los siguientes datos característicos.

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

El valor K resultante 3,05 x 10", se utiliza entonces para calcular la respuesta teórica del detector si el 100 % del polímero inyectado eluye a través del detector.

▼B

A.20. COMPORTAMIENTO DE DISOLUCIÓN/EXTRACCIÓN

1. MÉTODO

El método descrito es copia de la versión revisada del documento TG 120 de la OCDE (1997). Se encontrará más información técnica en la referencia 1.

1.1. INTRODUCCIÓN

Para algunos polímeros como los polímeros emulsionados, puede ser necesario un trabajo preparatorio antes de que pueda aplicarse el método indicado. El método no es aplicable a los polímeros líquidos ni a los que reaccionan con el agua en las condiciones del ensayo.

Cuando el proceso es poco práctico o inaplicable, el comportamiento de disolución/extracción se puede estudiar por medio de otros métodos. Deberán entonces indicarse los detalles y la justificación del método empleado.

1.2 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El comportamiento de disolución/extracción de los polímeros en medio acuoso se determina con ayuda del método de frasco (véase A.6, «Hidrosolubilidad, método de frasco») con las modificaciones siguientes.

1.4. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.5.1. **Equipo**

Es necesario el equipo siguiente:

— material de trituración, por ejemplo, triturador que produzca partículas de tamaño conocido,

— agitador, con posibilidad de ajuste de la temperatura,

— sistema de filtro de membrana,

— equipo analítico adecuado,

— tamices normalizados,

1.5.2. **Preparación de la muestra**

En primer lugar, una muestra representativa debe reducirse a partículas de tamaño incluido entre 0,125 y 0,25 mm con ayuda de los tamices convenientes. Puede ser necesario enfriar para garantizar la estabilidad de la muestra o para el proceso de trituración. Los materiales de carácter gomoso pueden triturarse a la temperatura del nitrógeno líquido (1).

Si no se puede llegar al tamaño de partículas requerido, se intentará reducir el tamaño de las partículas en la medida de lo posible y se indicará el resultado. Es necesario que en el informe se indique cómo se ha conservado antes del ensayo la muestra triturada.

▼B

1.53. **Procedimiento**

Se pesan tres muestras de 10 g de sustancia de ensayo en cada uno de los tres frascos equipados de tapones de vidrio; se añaden 1 000 ml de agua a cada uno. Si resulta difícil manipular una cantidad de 10 g de polímero, se utilizará la cantidad inmediata superior que pueda manipularse y se ajustará en consecuencia el volumen de agua.

Los frascos se tapan firmemente y se agitan después a 20 ºC. El dispositivo utilizado para sacudir o agitar será capaz de funcionar a temperatura constante. Después de 24 h, se centrifuga o filtra el contenido de cada frasco y se determina por un método de análisis conveniente la concentración de polímero en la fase acuosa clara. Si no se dispone de ningún método de análisis adecuado para la fase acuosa, se podrá considerar la solubilidad/extractividad total a partir del peso seco del residuo filtrado o del precipitado centrifugado.

Es generalmente necesario diferenciar cuantitativamente las impurezas y aditivos por una parte, y las especies de bajo peso molecular por otra parte. En caso de determinación gravimétrica, es importante también realizar un ensayo en blanco, sin utilizar la sustancia de ensayo, para poder tener en cuenta los residuos derivados del procedimiento experimental.

El comportamiento de disolución/extracción de los polímeros en el agua a 37 ºC a pH2 y pH9 puede determinarse como se ha descrito para el experimento a 20 ºC. Los valores de pH pueden obtenerse por adición de amortiguadores convenientes o de ácidos o bases adecuados, como ácido clorhídrico, ácido acético, hidróxido de potasio o de sodio de grado analítico, o NH_3.

Según el método de análisis empleado, se procederá a uno o dos ensayos. Cuando se disponga de métodos suficientemente específicos para un análisis directo en la fase acuosa del componente polimérico, bastará con un ensayo tal como se describe arriba. Sin embargo, cuando no se disponga de tales métodos y la determinación del comportamiento de disolución/extracción del polímero se límite a un análisis indirecto que determina solamente el contenido total en carbono orgánico (COT) del extracto acuoso, será necesario efectuar un segundo ensayo. Este se realizará también por triplicado, con muestras de polímeros diez veces más pequeñas y las mismas cantidades de agua que en el primer ensayo.

1.5.4. **Análisis**

1.5.4.1. *Ensayo realizado con un único tamaño de muestra*

Se dispondrá quizá de métodos de análisis directo de los componentes poliméricos en la fase acuosa. Si no, se podrá considerar también un análisis indirecto de los componentes poliméricos disueltos/extraídos determinando el contenido total de las partes solubles y aportando las correcciones necesarias que tendrán en cuenta los componentes no específicamente poliméricos.

Se puede proceder al análisis del conjunto de las especies poliméricas de la fase acuosa:

con ayuda de un método suficientemente sensible como, por ejemplo:

— COT, con digestión por persulfato o bicromato para liberar CO_2, seguida de una estimación por IR o análisis químico,

▼B

— espectrometría de absorción atómica (AAS) o su equivalente de emisión de plasma acoplado por inducción (ICP) para polímeros que contienen silicio o metales,

— absorción UV o espectrofluorometría para los polímeros arílicos,

— espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS) para las muestras de bajo peso molecular,

o por evaporación al vacío hasta estado seco del extracto acuoso y análisis espectroscopio (IR, UV, etc.} o análisis AAS/ICP del residuo.

Si el análisis de la fase acuosa como tal no es realizable, el extracto acuoso se someterá a extracción con ayuda de un disolvente orgánico inmiscible con el agua, por ejemplo, un hidrocarburo clorado. El disolvente se evapora a continuación y el residuo se analiza como se índica arriba para determinar su contenido en el polímero correspondiente. Todos los componentes de este residuo identificados como impurezas o aditivos deben restarse para determinar el grado de disolución/extracción del propio polímero.

Cuando estén presentes cantidades relativamente importantes de estos materiales, puede ser necesario someter los residuos a un análisis por CLAR o CG, por ejemplo, para diferenciar las impurezas presentes de las especies monoméricas y derivadas de los monómeros, de modo que pueda determinarse el contenido auténtico de estas últimas.

En algunos casos, pueden bastar la simple evaporación del disolvente orgánico hasta el estado seco y el peso del residuo seco.

1.5.4.2. *Ensayo realizado con dos tamaños de muestras diferentes*

El COT se analizará en todos los extractos acuosos.

Se procederá a una determinación por gravimetría de la parte no disuelta/no extraída de la muestra. Si después de centrifugación o filtrado del contenido de cada frasco, sigue habiendo residuos poliméricos pegados a las paredes de este, se enjuagará con el filtrado hasta que el frasco quede libre de todos los residuos visibles. Luego se filtrará o se centrifugará de nuevo el filtrado. Los residuos que permanezcan sobre el filtro o en el tubo de centrifugación se secan a 40 ºC al vacío y se pesan. La operación de secado se prolonga hasta llegar a un peso constante.

2. **RESULTADOS**

2.1. ENSAYO REALIZADO CON UN ÚNICO TAMAÑO DE MUESTRA

Se darán los resultados individuales de cada uno de los tres frascos y los valores medios, expresados en unidades de masa por volumen de solución (normalmente en mg/1) o de masa por masa de muestra de polímero (normalmente en mg/g). Además, se indicará también la pérdida de peso de la muestra (calculada como el peso de soluto dividido por el peso de la muestra inicial). Se calculará la desviación típica relativa (RSD). Se darán cifras individuales de la sustancia total (polímero + aditivos esenciales, etc.) y del polímero solo (es decir, después de sustracción de la participación de estos aditivos).

▼B

2.2. ENSAYO REALIZADO CON DOS TAMAÑOS DIFERENTES DE MUESTRAS

Se darán los valores de COT individuales de los extractos acuosos de las dos experiencias por triplicado y el valor medio de cada experiencia, en unidades de masa por volumen de solución (normalmente en mg C/l), así como en unidades de masa por peso de la muestra inicial (normalmente en mg C/g).

Sí no hay diferencia entre los resultados con elevada proporción muestra/agua y con baja proporción muestra/agua, se podrá suponer que todos los componentes, susceptibles de extraerse se han extraído realmente. En este caso, el análisis directo no sería necesario en principio.

Se darán los pesos individuales de los residuos y se expresarán en porcentaje de los pesos inicíales de las muestras. Las medias se calcularán para cada experiencia. Las diferencias entre 100 y los porcentajes encontrados representan los porcentajes de materiales solubles y extraíbles en la muestra original.

3. **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

3.1.1 **Sustancia de ensayo**

— Información disponible sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas, contenido en especies de bajo peso molecular).

3.1.2. **Condiciones experimentales**

— Descripción de los procedimientos utilizados y de las condiciones experimentales.

— Descripción de ios métodos de análisis y de detección.

3.1.3 **Resultados**

— Resultados de solubilidad/extractividad en mg/1; valores individuales y medios para los ensayos de extracción en las distintas soluciones, desglose del contenido en polímeros e impurezas, aditivos, etc.

— Resultados de solubilidad/extractividad en mg/g de polímero.

— Valores de COT de los extractos acuosos, peso del soluto y porcentajes calculados, si se miden.

— pH de cada muestra.

— Información sobre los valores en blanco.

— En caso necesario, referencias a la inestabilidad química de la sustancia de ensayo, tanto durante el procedimiento de ensayo como durante los análisis.

— Toda la información importante para la interpretación de los resultados.

4. **REFERENCIAS**

(1) DIN 53733 (1976) *Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.*

▼B

A.21. **PROPIEDADES COMBURENTES (LÍQUIDOS)**

1. **MÉTODO**

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método se ha diseñado para medir el potencial de una sustancia líquida de incrementar la velocidad o la intensidad de combustión de una sustancia combustible, o de provocar la inflamabilidad espontánea cuando se mezcla homogéneamente con una sustancia combustible. Se funda en el ensayo de la ONU de líquidos comburentes (1) y ambos son equivalentes. No obstante, dado que el método A.21 se ha diseñado ante todo para cumplir los requisitos establecidos en la Directiva 67/548/CEE, es suficiente efectuar la comparación con una sola sustancia de referencia. Si está previsto emplear los resultados del ensayo para otros fines ([1]), puede ser necesario realizar el ensayo y la comparación con varias sustancias de referencia.

Si el análisis de la fórmula estructural excluye toda duda razonable de que la sustancia pueda reaccionar exotérmicamente con un material combustible, no será preciso realizar el ensayo.

Antes de llevar a cabo el ensayo, conviene disponer de información preliminar sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia.

Este ensayo no puede realizarse con sólidos, gases, sustancias explosivas o altamente inflamables ni peróxidos orgánicos.

Si ya se dispone de los resultados del ensayo de la ONU de líquidos comburentes (1) para la sustancia en cuestión, no será necesario realizar el presente ensayo,

1.2 DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo medio de aumento de la presión: media de los tiempos medidos para que la presión de la mezcla de ensayo aumente de 690 kPa a 2 070 kPa (presión manométrica).

1.3 SUSTANCIA DE REFERENCIA

La sustancia de referencia ha de ser ácido nítrico acuoso (pureza de grado analítico) al 65 % (p/p) ([2]).

([1]) Por ejemplo, en el marco de las normas de transporte de la ONU.
([2]) Debe valorarse el ácido antes del ensayo para confirmar su concentración.

▼B

Si el experimentador prevé que los resultados del ensayo pueden emplearse para otros fines, cabe realizar el ensayo con otras sustancias de referencia ([1]).

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se mezcla el líquido que va a estudiarse en proporción de 1/1, en masa, con celulosa fibrosa y se introduce en un recipiente a presión. Si se produce una combustión espontánea durante la mezcla o la introducción, no es necesario proseguir el ensayo.

En caso contrario, se lleva a cabo el ensayo completo. Se calienta]a mezcla en el recipiente a presión y se mide el tiempo medio que tarda la presión en aumentar de 690 kPa a 2 070 kPa (presión manométrica). Se compara el resultado con el tiempo medio de aumento de la presión de una mezcla 1/1 de la sustancia o sustancias de referencia y celulosa.

1.5 CRITERIOS DE CALIDAD

En una serie de cinco pruebas con la misma sustancia ningún resultado debe diferir en más del 30 % de la media aritmética. En caso contrario, es preciso descartar los resultados que difieran en más del 30 % de la media aritmética, mejorar la técnica de mezcla e introducción y repetir el ensayo.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1 **Preparación**

1.6.1.1 *Sustancia combustible,*

Se emplea como material combustible celulosa fibrosa deshidratada, cuyas fibras tengan Una longitud comprendida entre 50 y 250 μm y un diámetro medio de 25 μm ([2]). La celulosa se deshidrata hasta peso constante en una capa de espesor máximo de 25 mm a 105 ºC durante 4 horas y se conserva en un desecador, con desecante, hasta que sé enfríe y vaya a utilizarse. El contenido acuoso de la celulosa deshidratada ha de ser inferior al 0,5 % de la masa deshidratada ([3]). Si es preciso, se prolonga el tiempo de deshidratación ([4]). Debe emplearse el mismo lote de celulosa para todo el ensayo.

([1]) Por ejemplo, en la referencia bibliográfica 1 se emplean ácido perclórico al 50 % (p/p) y clorato de sodio al 40 % (p/p).

([2]) Por ejemplo, celulosa en polvo para columna de cromatografía Whatman CF 11, nº de catálogo 4021 050.

([3]) Confirmado, por ejemplo, mediante valoración de Karl-Fisher.

([4]) También puede obtenerse ese contenido acuoso (por ejemplo) calentando la celulosa a 105 ºC al vacío durante 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Equipo*

1.6.1.2.1 Recipiente a presión

Se necesita un recipiente a presión, formado por un cilindro de acero de 89 mm de largo y 60 mm de diámetro exterior (véase la figura 1). Se practican dos rebajes planos diametralmente opuestos (que reducen esa sección transversal del recipiente a 50 mm) para inmovilizarlo mientras se ajustan la pieza de encendido y la de sujeción del diafragma de seguridad. El recipiente ha de tener una luz de 20 mm, que se ensanchará a ambos extremos del cilindro rebajando las paredes internas en una longitud de 19 mm y se fileteará de manera que pueda alojar una rosca del tipo *British Standard Pipe* (BSP) de 1" o su equivalente métrico. En la superficie convexa del recipiente, a 35 mm de un extremo y a 90° de los rebajes planos, se enrosca un tubo lateral que servirá para medir la presión. El extremo del tubo estará provisto de una rosca de 1/2" BSP (o su equivalente métrico), que se ajustará en una cavidad de 12 mm de profundidad practicada en la pared del recipiente y fileteada debidamente. Si es necesario, se sella con un material inerte para evitar la fuga de gas. El tubo lateral sobresale 55 mm del recipiente a presión y tiene una luz de 6 mm. La cara interna del extremo libre del tubo se rebaja y filetea para que pueda alojar un transductor de presión de tipo diafragmático. Puede emplearse cualquier medidor de presión que no sufra alteraciones debido a los gases calientes ni a los productos de descomposición y que pueda detectar aumentos de presión de 690 a 2 070 kPa en menos de 5 ms.

Se cierra el extremo del recipiente más alejado del tubo lateral con una pieza de encendido provista de dos electrodos, uno de ellos aislado del cuerpo de la pieza y el otro unido a masa con este. El otro extremo del recipiente se obtura con un diafragma de seguridad (presión aproximada de rotura: 2 200 kPa), que se mantiene en su lugar mediante una pieza de sujeción que presenta una luz de 20 mm. Si es necesario, se sella la pieza de encendido con material inerte para evitar la fuga de gas. Para mantener el conjunto en la posición correcta durante la utilización, se emplea un soporte de acero suave (figura 2), que suele estar formado por una base de 235 mm × 184 mm × 6 mm y un tubo hueco de sección cuadrada (70 mm × 70 mm × 4 mm) de 185 mm de longitud.

En uno de los extremos del tubo cuadrado se seccionan dos caras opuestas, de manera que se obtenga un tubo de 86 mm de largo prolongado por dos lados planos a modo de patas, que se cortan para que, una vez soldado a la base, el tubo forme un ángulo de 60º con la horizontal. En el extremo superior de una de las caras del tubo se practica una muesca de 22 mm de ancho y 46 mm de profundidad, de manera que, al colocar el recipiente a presión en el soporte con la pieza de encendido hacia abajo, el tubo lateral para medir la presión quede alojado en ella. En la cara interna de la pared del tubo orientada hacia abajo se suelda una pieza de acero de 30 mm de ancho y 6 mm de grueso para que sirva de separador. En la pared opuesta se hacen dos orificios y se enroscan dos tornillos de palomilla de 7 mm para fijar el recipiente a presión. Para sujetar el recipiente desde abajo, se sueldan dos rebordes de acero de 12 mm de ancho y 6 mm de grueso a los laterales de la parte inferior de la sección cuadrada.

▼B

1.6.1.2.2 Dispositivo de ignición

El dispositivo de ignición está integrado por un hilo de Ni/Cr de 25 cm de largo y 0,6 mm de sección, con una resistencia de 3,85 ohm/m. El hilo se enrolla en forma de bobina con una varilla de 5 mm de diámetro y se une a los electrodos de la pieza de encendido. La bobina ha de ajustarse a uno de los esquemas de la figura 3. La distancia entre la cara superior de la pieza de encendido y. la cara inferior de la bobina de ignición debe ser de 20 mm. Si los electrodos no son regulables, los segmentos de hilo que se encuentran entre la bobina y la cara superior de la pieza de encendido deben aislarse con un revestimiento cerámico. El hilo se calienta mediante una alimentación eléctrica-estable que proporcione una intensidad de 10 A como mínimo.

1.6.2 **Realización del ensayo** ([1])

Se coloca en el soporte el recipiente montado con el transductor de presión y el dispositivo de ignición, pero sin el diafragma de seguridad, con la pieza de encendido hacia abajo. Se introducen 2,5 g del líquido que vaya a someterse a ensayo y 2,5 g de celulosa deshidratada en una copa de vidrio y se mezclan con un agitador de cristal ([2]). Por motivos de seguridad, la persona que realice la mezcla debe interponer una pantalla protectora. Si se produce una combustión espontánea' durante la mezcla o la introducción, no es necesario proseguir el ensayo. Se introduce la mezcla en pequeñas cantidades en el recipiente a presión dando ligeros golpecitos y se comprueba que la mezcla rodea bien y está en contacto con la bobina de ignición sin dejar hueco. La bobina no debe deformarse durante este proceso, pues ello podría falsear los resultados ([3]). Se coloca en su lugar el diafragma de seguridad y se enrosca al máximo la pieza de sujeción. Se coloca el recipiente cargado en el soporte con el disco de seguridad hacia arriba y se introduce el conjunto en una campana extractora blindada o una cámara de fuego. Se conectan los bornes externos de la pieza de encendido a una alimentación eléctrica y se aplica una corriente de 10 A. No deben transcurrir más de 10 minutos entre el inicio de la preparación de la mezcla y el momento en que se aplica la corriente.

La señal emitida por el transductor de presión se recoge en un sistema que permita el registro continuo de la curva presión/tiempo y su análisis (por ejemplo, un registrador de señales transitorias acoplado a un registrador sobre cinta de papel). Se calienta la mezcla hasta que se rompa el diafragma de seguridad o durante un tiempo mínimo de 60 s. Si no se ha roto el diafragma, debe esperarse a que la mezcla se enfríe antes de abrir el recipiente con prudencia y tomando las debidas precauciones por si estuviera aún a presión. Se realizan cinco ensayos con la mezcla y con la sustancia o sustancias de referencia. Se registra el tiempo que tarda la presión en aumentar de 690 kPa a 2 070 kPa (presión manométrica). Se calcula la media de los tiempos registrados.

En algunos casos, las sustancias pueden generar un aumento de presión (demasiado elevado o demasiado escaso) debido a reacciones químicas que no son características de las propiedades comburentes de dichas sustancias. Puede entonces ser necesario repetir el ensayo sustituyendo la celulosa por un material inerte, como la diatomita (kieselguhr), para cerciorarse de que no se trata de un efecto no comburente.

([1]) Las mezclas de sustancias comburentes y celulosa deben tratarse como potencialmente explosivas y manipularse con las debidas precauciones.

([2]) En la práctica, puede prepararse una mezcla 1/1 de líquido problema y celulosa en cantidad superior a la necesaria para el ensayo, tomar 5 ± 0,1 g e introducirlos en el recipiente a presión. La mezcla debe prepararse justo antes de cada ensayo.

([3]) Debe evitarse sobre todo que entren en contacto las circunvoluciones adyacentes de la bobina.

▼B

2. **RESULTADOS**

Tiempos de aumento de la presión con la sustancia de ensayo y con la sustancia o sustancias de referencia. Tiempos de aumento de la presión con una sustancia inerte, si procede.

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se calcula el tiempo medio de aumento de la presión con la sustancia de ensayo y con la sustancia o sustancias de referencia.

Se calcula el tiempo medio de aumento de la presión con una sustancia inerte, si procede.

El cuadro 1 recoge algunos ejemplos de resultados.

Cuadro 1

Ejemplos de resultados [a]

Sustancia [b]	Tiempo medio de aumento de la presión con una mezcla de 1/1 de celulosa (ms)
Ácido nítrico, 65 %	4 767 [c]
Ácido perclórico, 50 %	121 [c]
Ácido perclórico, 55 %	59
Bicromato de amonio, en solución acuosa saturada	20 800
Clorato de sodio, en solución acuosa al 40 %	2 555 [c]
Nitrato de calcio, en solución acuosa saturada	6 700
Nitrato férrico, en solución acuosa saturada	4 133
Nitrato de níquel, en solución acuosa saturada	6 250
Nitrato de plata, en solución acuosa saturada	[d]
Nitrato de potasio, en solución acuosa al 30 %	26 690
Nitrato de sodio, en solución acuosa al 45 %	4 133
Perclorato de litio, en solución acuosa saturada	1 686
Perclorato de magnesio, en solución acuosa saturada	777
Sustancia inerte	
Agua/celulosa	[d]

[a] Véase la referencia bibliográfica (1) para la clasificación según el régimen de transporte de la ONU.
[b] Las soluciones saturadas deben prepararse a 20 ºC.
[c] Valor medio de ensayos interlaboratorios comparados.
[d] No se alcanza la presión máxima de 2 070 kPa.

▼B

3. **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

En el informe del ensayo debe figurar la información siguiente:

— identidad, composición, pureza, etc. de la sustancia de ensayo,

— concentración de la sustancia de ensayo,

— procedimiento empleado para deshidratar la celulosa,

— contenido acuoso de la celulosa empleada,

— resultados de las mediciones,

— resultados de los ensayos con la sustancia inerte, si procede,

— tiempos medios calculados de aumento de la presión,

— cualquier desviación respecto al presente método y justificación correspondiente,

— cualquier información u observación complementaria importante para interpretar los resultados;

3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS ([1])

La evaluación de los resultados del ensayo se fundará en los siguientes criterios:

a) la mezcla de sustancia de ensayo y celulosa se inflama espontáneamente o no;

b) la comparación del tiempo medio de aumento de la presión de 690 kPa a 2 070 kPa con el tiempo medio correspondiente a la sustancia o sustancias de referencia.

Se considerará que una sustancia líquida es comburente si:

a) una mezcla de 1/1 en masa de dicha sustancia y celulosa se inflama espontáneamente, o

b) el tiempo medio de aumento de la presión de una mezcla de 1/1 en masa de dicha sustancia y celulosa es inferior ó igual al tiempo medio de una mezcla de 1/1 en masa de ácido nítrico acuoso al 65 % (p/p) y celulosa.

Con el fin de evitar falsos positivos, a la hora de interpretar los resultados deben tomarse en consideración los resultados del ensayo con la sustancia y un material inerte.

([1]) Véase la referencia bibliográfica 1 para la interpretación de los resultados conforme a las normas de transporte de la ONU en caso de que se utilicen varias sustancias de referencia.

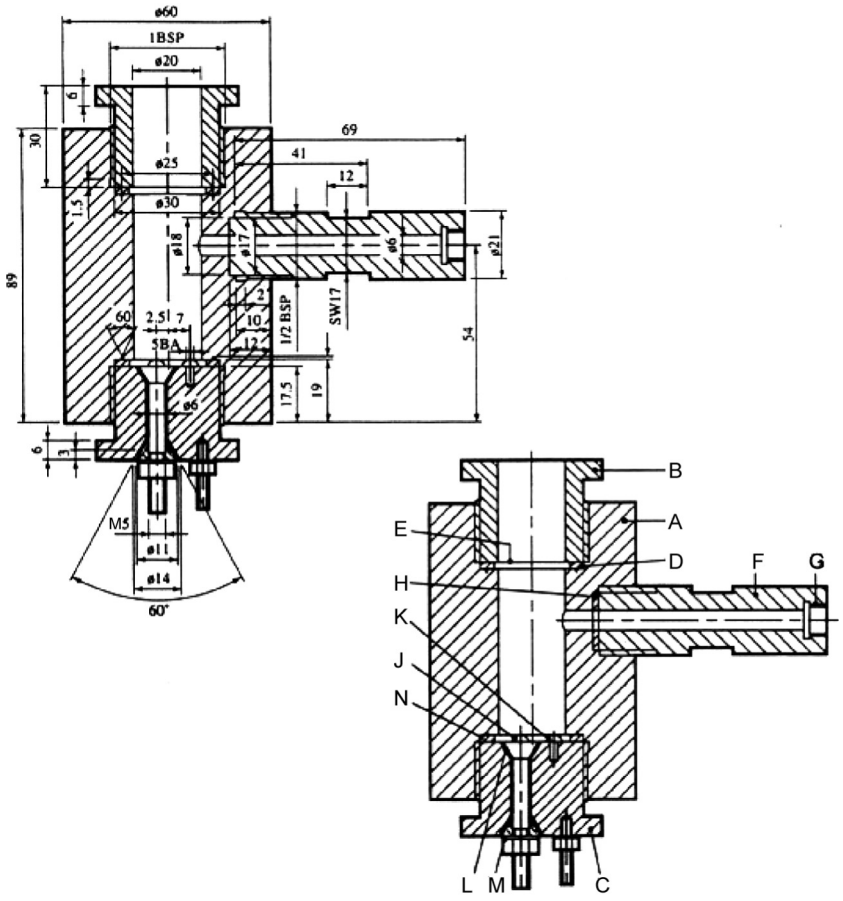
▼B

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 2- edición revisada. Publicación de la ONU nº ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Figura 1

Recipiente a presión



A = Cuerpo del recipiente a presión

B = Sujeción del diafragma de seguridad

C = Pieza de encendido

D = Junta de plomo blando

E = Diafragma de seguridad

F = Tubo-toma de presión

G = Rosca para transductor de presión

H = Junta

J = Electrodo aislado

K = Electrodo unido a masa

L = Aislamiento

M = Cono de acero

N = Ranura de deformación de la junta

▼B

Figura 2

Soporte

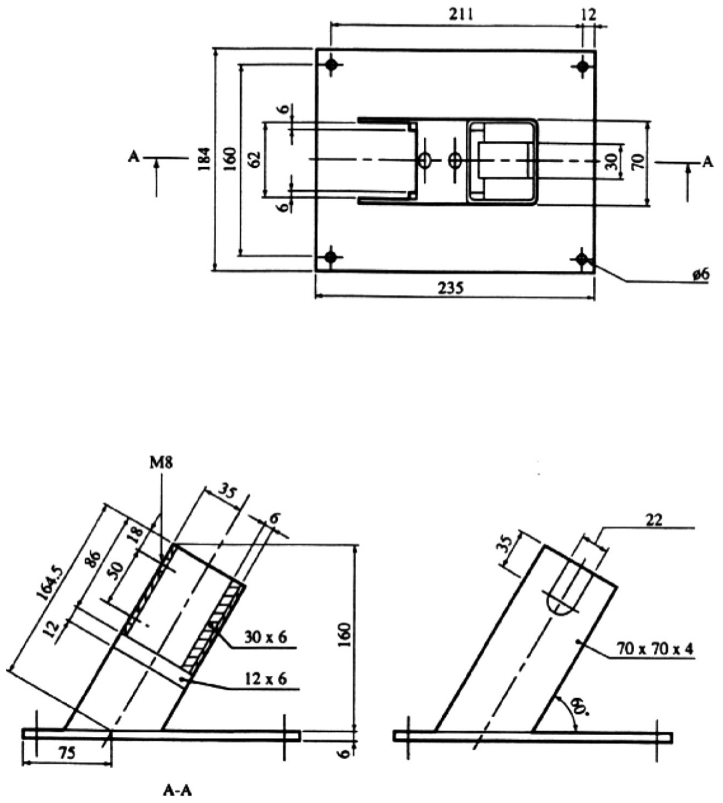
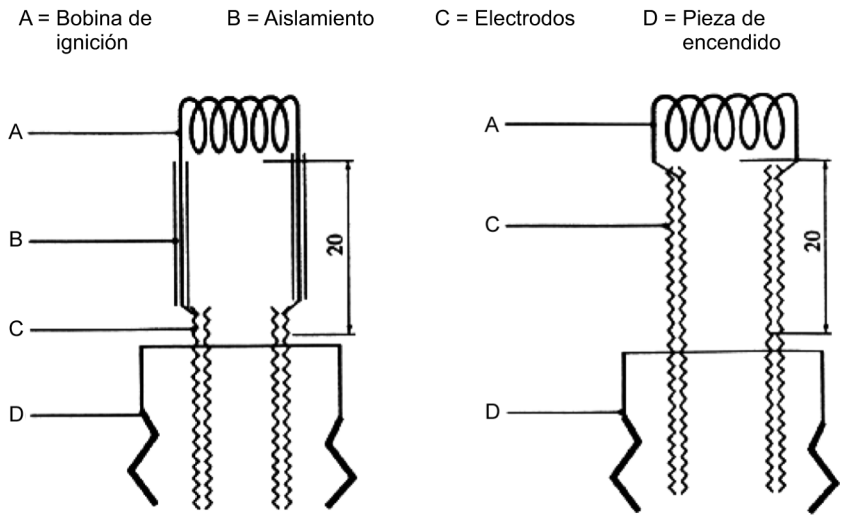


Figura 3

Dispositivo de ignición



Nota: cualquiera de estas dos configuraciones puede ser utilizada.

▼M1

A.22. DIÁMETRO MEDIO GEOMÉTRICO DE LAS FIBRAS PONDERADO POR LA LONGITUD

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método describe un procedimiento para medir el diámetro medio geométrico ponderado por la longitud (DMGPL) de las fibras minerales artificiales a granel. Como el DMGPL de la población tendrá una probabilidad del 95 % de encontrarse entre los límites del intervalo de confianza del 95 % [DMGPL ± dos errores estándar (EE)] de la muestra, el valor registrado (resultado de la prueba) será el límite inferior de confianza del 95 % de la muestra (DMGPL-2EE). El método se basa en la actualización, de junio de 1994, de un proyecto de procedimiento industrial del HSE, adoptado en la reunión entre este organismo y la ECFIA que se celebró en Chester el 26 de septiembre de 1993, y modificado en relación con un segundo ensayo interlaboratorios (1, 2). Este método de medición puede utilizarse para caracterizar el diámetro de las fibras de sustancias o productos a granel que contengan fibras minerales artificiales, incluidas las fibras cerámicas refractarias, las fibras vítreas artificiales y las fibras cristalinas y policristalinas.

La ponderación por la longitud es una forma de compensar el efecto que tiene sobre la distribución de los diámetros la ruptura de las fibras largas en el momento de manipular el material o de tomar muestras de él. Para medir la distribución por tamaños de los diámetros de las fibras minerales artificiales se utiliza la media geométrica porque esta distribución suele aproximarse a la normal logarítmica.

Sería pesado y llevaría mucho tiempo medir la longitud además del diámetro, pero si se miden solo las fibras que tocan una línea infinitamente fina en un campo de visión del microscopio electrónico de barrido, la probabilidad de seleccionar una fibra determinada es proporcional a su longitud. Como así se tiene en cuenta la longitud a efectos de la ponderación, la única medición necesaria es la del diámetro, y el resultado (DMGPL-2EE) puede calcularse de la forma descrita.

1.2. DEFINICIONES

Partícula: objeto cuya relación longitud/grosor es inferior a 3:1.

Fibra: objeto cuya relación longitud/grosor (relación de aspecto) es al menos de 3:1.

1.3. ÁMBITO Y LIMITACIONES

El método está concebido para estudiar distribuciones de diámetros con medianas entre 0,5 μm y 6 μm. Es posible medir diámetros más grandes mediante el uso de un número menor de aumentos del microscopio electrónico de barrido, pero el método estará más limitado para distribuciones de fibras más finas, por lo que se recomienda una medición con microscopio electrónico de transmisión si el diámetro medio está por debajo de 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se toma una serie de muestras cilíndricas representativas de la placa de fibras o de las fibras sueltas a granel. Se reduce la longitud de las fibras a granel mediante aplastamiento, y se dispersa en agua una submuestra representativa. Se extraen alícuotas que se pasan por un filtro de policarbonato de 0,2 μm de diámetro de poro, y se preparan para su examen mediante microscopia electrónica de barrido. Se miden los diámetros de las fibras con un número de aumentos en pantalla de 10 000 o mayor ([1]), utilizando el método de intersección con una línea, a fin de obtener una estimación no sesgada del diámetro mediano. Se calcula el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % (a partir de un ensayo unilateral) para obtener una estimación del valor mínimo del diámetro medio geométrico de las fibras del material.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.5.1. **Seguridad/precauciones**

Debe reducirse al mínimo la exposición del personal a las fibras presentes en el aire, y la manipulación de las fibras secas debe efectuarse en una campana de gases o en un aislador (cabina de seguridad con guantes). Debe procederse a un seguimiento periódico de la exposición del personal para determinar la eficacia de los métodos de reducción. Para manipular fibras minerales artificiales hay que llevar guantes desechables, a fin de reducir la irritación de la piel y evitar la contaminación cruzada.

1.5.2. **Equipo**

— Prensa y troqueles (capaces de alcanzar 10 MPa).

— Filtros capilares de policarbonato de 0,2 μm de diámetro de poro (25 mm de diámetro).

— Filtro de membrana de ésteres de celulosa de 5 μm de diámetro de poro, utilizado como soporte del filtro.

— Equipo de filtración de vidrio (o sistema de filtración desechable) válido para filtros de 25 mm de diámetro (por ejemplo, equipo de microanálisis de vidrio de Millipore, tipo XX10 025 00).

— Agua recién destilada, pasada por un filtro de 0,2 μm de diámetro de poro para eliminar los microorganismos.

— Revestidor de pulverización con objetivo de oro o de oro/paladio.

— Microscopio electrónico de barrido capaz de llegar a una resolución de 10 nm y de proporcionar 10 000 aumentos.

— Otro material: espátulas, hojas de bisturí de tipo 24, pinzas, tubos de microscopio electrónico de barrido, pegamento de carbono o cinta adhesiva de carbono, plata coloidal.

— Sonda de ultrasonidos o baño de ultrasonidos de sobremesa.

— Muestreador de cilindro o sacabocados, para tomar muestras cilíndricas de una placa de fibras minerales artificiales.

([1]) Este número de aumentos está indicado para fibras de 3 μm; en caso de fibras de 6 μm puede ser más adecuado utilizar 5 000 aumentos.

▼**M1**

1.5.3. **Procedimiento**

1.5.3.1. *Muestreo*

En caso de mantas o placas, se utiliza un muestreador de cilindro de 25 mm o un sacabocados para tomar muestras de la sección transversal. Las muestras deben tomarse de puntos situados a intervalos iguales a lo ancho de una pequeña longitud de la placa, o bien de zonas aleatorias si se dispone de grandes longitudes de placa. El mismo equipo puede utilizarse para extraer muestras aleatorias de fibras sueltas. A ser posible, deben tomarse seis muestras para tener en cuenta las variaciones espaciales del material a granel.

Las seis muestras cilíndricas deben aplastarse en un troquel de 50 mm de diámetro a la presión de 10 MPa. Se mezcla el material con la espátula y se vuelve a someter a 10 MPa. Después se saca el material del troquel y se conserva en un frasco de cristal herméticamente cerrado.

1.5.3.2. *Preparación de la muestra*

En caso necesario puede eliminarse el eventual ligante orgánico poniendo las fibras en un horno a 450 °C durante una hora aproximadamente.

Formar un cono y separar en partes para subdividir la muestra (esta operación debe realizarse dentro de una campana de gases).

Con ayuda de una espátula, añadir una pequeña cantidad (< 0,5 g) de muestra a 100 ml de agua recién destilada que se ha pasado a través de un filtro de membrana de 0,2 μm (pueden utilizarse otras fuentes de agua ultrapura si se demuestra que son satisfactorias). Dispersar totalmente utilizando una sonda de ultrasonidos con una potencia de 100 W y ajustada de forma que se produzca cavitación. (Si no se dispone de sonda, utilizar el método siguiente: agitar repetidamente e invertir durante 30 segundos; poner durante cinco minutos en baño de ultrasonidos de sobremesa; volver a agitar repetidamente e invertir durante otros 30 segundos.)

Inmediatamente después de la dispersión de las fibras, tomar una serie de alícuotas (por ejemplo, tres alícuotas de 3, 6 y 10 ml) con una pipeta de boca ancha (de 2 a 5 ml de capacidad).

Filtrar en vacío cada alícuota a través de un filtro de policarbonato de 0,2 μm, puesto sobre un filtro de soporte de MEC de 5 μm, utilizando un embudo de filtración de vidrio de 25 mm, con depósito cilíndrico. Deben ponerse en el embudo unos 5 ml de agua destilada filtrada; la alícuota se pipetea lentamente al interior del agua, manteniendo la punta de la pipeta por debajo del menisco. La pipeta y el depósito deben enjuagarse a fondo después, ya que las fibras más finas tienden a situarse más en la superficie.

Tomar cuidadosamente el filtro y separarlo del filtro de soporte antes de ponerlo en un recipiente para que se seque.

▼M1

Cortar una sección de un cuarto o un medio de lo retenido en el filtro con una hoja de bisturí de tipo 24, mediante un movimiento de vaivén. Poner cuidadosamente la sección cortada en un portaobjetos de microscopio electrónico de barrido utilizando una lengüeta adhesiva de carbono o pegamento de carbono. Debe ponerse plata coloidal al menos en tres posiciones para mejorar el contacto eléctrico en los bordes del filtro y del portaobjetos. Una vez secos el pegamento y la plata coloidal, revestir la superficie de la muestra con aproximadamente 50 nm de oro u oro/paladio mediante pulverización.

1.5.3.3. *Calibración y funcionamiento del microscopio electrónico de barrido*

1.5.3.3.1. Calibración

La calibración del microscopio electrónico de barrido debe comprobarse al menos una vez por semana (lo ideal es una vez al día) mediante una rejilla de calibración certificada. La calibración debe comprobarse frente a un patrón certificado y, si el valor medido no está en el intervalo de ± 2 % del valor certificado, es necesario ajustar la calibración y volver a comprobarla.

El microscopio debe ser capaz de resolver al menos un diámetro visible mínimo de 0,2 μm, utilizando una matriz de muestra real, a 2 000 aumentos.

1.5.3.3.2. Funcionamiento

El microscopio debe funcionar a 10 000 aumentos ([1]), en condiciones que den una buena resolución con una imagen aceptable a velocidad baja de exploración, como, por ejemplo, 5 segundos por pantalla. Aunque pueden variar los requisitos de funcionamiento de los distintos microscopios electrónicos de barrido, para obtener la mejor visibilidad y resolución con materiales de peso atómico relativamente bajo debe utilizarse en general una tensión de aceleración de 5 a 10 keV, habiéndose fijado un pequeño tamaño del punto y una corta distancia de trabajo. Como se efectúa un recorrido lineal, debe utilizarse una inclinación de 0º para minimizar el reenfoque o bien, si el microscopio tiene una platina eucéntrica, debe utilizarse la distancia de trabajo eucéntrica. Puede utilizarse un número menor de aumentos si el material solo contiene fibras de diámetro grande (> 5 μm).

1.5.3.4. *Medición*

1.5.3.4.1. Examen con pocos aumentos para evaluar la muestra

La muestra debe examinarse inicialmente con pocos aumentos para ver si hay indicios de aglutinación de fibras grandes y para evaluar la densidad de las fibras. En caso de aglutinamiento excesivo, se recomienda preparar una muestra nueva.

Para conseguir una buena exactitud estadística, es necesario medir un número mínimo de fibras, y parece conveniente tener una elevada densidad de fibras, ya que examinar campos vacíos supone un gasto de tiempo que no aporta nada al análisis. Sin embargo, si el filtro está superpoblado, se hace difícil medir todas las fibras medibles y es posible pasar por alto las fibras pequeñas que puedan estar ocultas por otras mayores.

([1]) En caso de fibras de 3 μm, véase la nota anterior.

▼**M1**

Puede aparecer un sesgo de sobreestimación del DMGPL si la densidad supera las 150 fibras por milímetro de recorrido lineal. Por otra parte, una baja concentración de fibras supone un aumento del tiempo de análisis, y suele ser más rentable preparar una muestra con una densidad de fibras próxima a la óptima, en vez de seguir haciendo recuentos con filtros de baja concentración. La densidad óptima de fibras debe proporcionar una media de una o dos fibras contables por campo de visión a 5 000 aumentos. Sin embargo, la densidad óptima depende del tamaño (diámetro) de las fibras, por lo que el operario debe utilizar su experiencia para decidir si la densidad de las fibras está próxima a la óptima o no.

1.5.3.4.2. Ponderación de los diámetros de las fibras por la longitud

Solo se cuentan las fibras que tocan (o cruzan) una línea (infinitamente) fina trazada en la pantalla del microscopio. Con este fin se traza una línea horizontal (o vertical) por el centro de la pantalla.

Otra posibilidad es situar un solo punto en el centro de la pantalla e iniciar una exploración en una sola dirección a través del filtro. Se mide y se registra el diámetro de cada fibra cuya relación longitud/grosor (relación de aspecto) sea superior a 3:1 y que toque o cruce este punto.

1.5.3.4.3. Medición de las fibras

Se recomienda medir como mínimo 300 fibras. Cada fibra se mide solo una vez en el punto de intersección con la línea o el punto trazado en la imagen (o cerca del punto de intersección si los bordes de las fibras están poco claros). Si se encuentran fibras de secciones transversales no uniformes, debe tomarse una medida que represente su diámetro medio. Ha de tenerse cuidado al definir el borde y medir la distancia más corta entre los bordes de la fibra. La medición puede hacerse directamente o bien después, con fotografías o imágenes grabadas. Son recomendables los sistemas semiautomáticos de medición de imágenes que descargan datos directamente a una hoja de cálculo, ya que así se ahorra tiempo, se eliminan errores de transcripción y pueden automatizarse los cálculos.

Debe comprobarse con pocos aumentos que los extremos de las fibras largas no se recurvan en el campo de visión de la medición y que solo se miden una vez.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los diámetros de las fibras no suelen tener una distribución normal. Sin embargo, mediante una transformación logarítmica es posible obtener una distribución que se aproxime a la normal.

Se calculan la media aritmética (lnD medio) y la desviación típica (DT_{lnD}) de los logaritmos neperianos (lnD) de los diámetros (D) de las n fibras.

$$\text{medio } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$DT_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{medio } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

La desviación típica se divide por la raíz cuadrada del número de mediciones (n) para obtener el error estándar (EE_{lnD}).

$$EE_{lnD} = \frac{DT}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Se resta de la media dos veces el error estándar y se calcula el exponencial del valor obtenido (media menos dos veces el error estándar) para dar la media geométrica menos dos errores estándar geométricos.

$$DMGPL - 2EE = e^{(\text{medio } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la siguiente información:

— el valor de DMGPL-2EE,

— las eventuales desviaciones y, en particular, las que puedan afectar a la precisión o a la exactitud de los resultados, con su justificación pertinente.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

(2) G. Burdett y G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23. COEFICIENTE DE REPARTO (1-OCTANOL/AGUA): MÉTODO DE AGITACIÓN LENTA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 123 (2006) de la OCDE. El método de agitación lenta (1) ha permitido determinar con exactitud el coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{OW}) con valores de hasta un log P_{OW} de 8,2. Por lo tanto, es un enfoque experimental idóneo para la determinación directa del P_{OW} de sustancias altamente hidrófobas.

2. Otros métodos para determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{OW}) son el método "de frasco de agitación" (2) y la determinación del P_{OW} basada en el comportamiento de retención en CLAR de fase inversa (3). El método "de frasco de agitación" es proclive a dar artefactos por la transferencia de microgotas de octanol a la fase acuosa. Al aumentar los valores de P_{OW}, la presencia de estas microgotas en la fase acuosa provoca una sobrevaloración creciente de la concentración de la sustancia problema en el agua. Por este motivo es aplicable solo a las sustancias con log $P_{OW}<4$. El segundo método se basa en los datos sólidos de valores de P_{OW} medidos directamente para calibrar la relación entre el comportamiento de retención en CLAR y los valores medidos de P_{OW}. Hubo un proyecto de directrices de la OCDE para determinar los coeficientes de reparto 1-octanol/agua de las sustancias ionizables (4), pero ya no está vigente.

3. Este método de ensayo ha sido desarrollado en los Países Bajos. La precisión de los métodos aquí descritos ha sido validada y optimizada en un estudio de validación interlaboratorios, en el que participaron quince laboratorios (5).

CONSIDERACIONES INICIALES

Fundamento y aplicación

4. Se ha observado una relación altamente significativa entre los coeficientes de reparto 1-octanol/agua (P_{OW}) de las sustancias orgánicas inertes y su bioacumulación en los peces. Por lo demás, se ha demostrado que el P_{OW} posee una buena correlación con la toxicidad en peces y también con la sorción de los compuestos químicos a sólidos como suelos y sedimentos. Una amplia visión general de estas relaciones se recoge en la bibliografía (6).

5. Se han establecido muy diversas relaciones entre el coeficiente de reparto 1-octanol/agua y otras propiedades de las sustancias relevantes para la química y toxicología medioambientales. Por esta razón, el coeficiente de reparto 1-octanol/agua se ha convertido en un parámetro clave en la evaluación del riesgo medioambiental de los compuestos químicos y de su destino final en el medio ambiente.

Ámbito de aplicación

6. Se considera que el ensayo de agitación lenta reduce la formación de microgotas a partir de las gotitas de 1-octanol en la fase acuosa. Por esta razón no hay riesgo de sobrevalorar la concentración acuosa debido a las moléculas de la sustancia problema asociadas a las gotitas. Así pues, el método de agitación lenta es particularmente aplicable a la determinación del P_{OW} de sustancias con valores esperados de log P_{OW} de 5 y mayores, en las que el método de frasco de agitación (2) tendería a dar resultados erróneos.

▼M4

DEFINICIONES Y UNIDADES

7. El coeficiente de reparto de una sustancia entre el agua y un disolvente lipófilo (1-octanol) define la distribución en equilibrio del compuesto químico entre las dos fases. El coeficiente de reparto entre el agua y el 1-octanol (P_{OW}) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de la sustancia problema en 1-octanol saturado con agua (C_O) y en agua saturada con 1-octanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Al ser un cociente entre dos concentraciones es adimensional. Se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal (log P_{OW}). El Pow es dependiente de la temperatura, por lo que los datos del informe incluirán la temperatura de la medición.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

8. Con el fin de determinar el coeficiente de reparto, se equilibran el agua, el 1-octanol y la sustancia problema a temperatura constante. Seguidamente se determinan las concentraciones de la sustancia problema en las dos fases.

9. Las dificultades experimentales asociadas a la formación de microgotas durante el experimento de frasco de agitación se consiguen reducir en el ensayo de agitación lenta que proponemos aquí. En el ensayo de agitación lenta, el agua, el 1-octanol y la sustancia problema se equilibran en un reactor agitado termostatizado. El intercambio entre las fases se acelera mediante agitación. La agitación introduce una turbulencia limitada, lo que facilita el intercambio entre el 1-octanol y el agua sin que se formen microgotas (1).

APLICABILIDAD DEL ENSAYO

10. Dado que la presencia de otras sustancias distintas podría influir en el coeficiente de actividad de la sustancia problema, se analizará esta como sustancia pura. En el ensayo de reparto 1-octanol/agua se empleará la sustancia de máxima pureza comercialmente disponible.

11. El presente método es aplicable a sustancias puras que no se disocian ni asocian y que no presentan una actividad interfacial importante. Permite determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua de estas sustancias y de sus mezclas. Cuando el método se aplica a las mezclas, los coeficientes de reparto 1-octanol/agua determinados son condicionales, al depender de la composición química de la mezcla analizada y de la composición de electrolitos utilizada en la fase acuosa. Siempre que se tomen medidas complementarias, el método es también aplicable a compuestos que se disocian o asocian (punto 12).

12. Debido a los múltiples equilibrios que intervienen en el reparto 1-octanol/agua de las sustancias que se disocian, como los ácidos orgánicos y los fenoles, las bases orgánicas y los compuestos organometálicos, el coeficiente de reparto 1-octanol/agua es una constante condicional que depende intensamente de la composición electrolítica (7) (8). Por consiguiente, para determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua es necesario controlar y documentar el pH y la composición electrolítica del ensayo. La evaluación de los coeficientes de reparto ha de confiarse al juicio de un experto. A partir del valor de la(s) constante(s) de disociación se elegirán los valores de pH idóneos, a fin de determinar un coeficiente de reparto por cada estado de ionización. Cuando se analizan compuestos organometálicos deben emplearse soluciones amortiguadores que no formen complejos (8). Teniendo en cuenta los datos conocidos sobre la química en medio acuoso (constantes de complejación, constantes de disociación), se elegirán las condiciones experimentales de modo tal que permita estimar la especiación de la sustancia problema en la fase acuosa. La fuerza iónica ha de ser idéntica en todos los ensayos, para lo cual se empleará un electrolito de fondo.

▼M4

13. Pueden surgir dificultades analíticas cuando se aplica el ensayo a sustancias con hidrosolubilidad baja o con P_{OW} elevado, pues en ese caso las concentraciones en el agua serán muy bajas, dificultando una determinación exacta. El presente método de ensayo facilita indicaciones para solventar esta dificultad.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

14. Los reactivos químicos serán de calidad analítica o de más alta pureza. Se recomienda el uso de sustancias problema no marcadas de composición química conocida y pureza preferiblemente del 99 %, al menos, o de sustancias problema radiomarcadas de composición química y pureza radioquímica conocidas. En caso de marcadores de semivida breve, deben aplicarse correcciones para tener en cuenta su desintegración. En caso de sustancias problema radiomarcadas, deberá emplearse un método de análisis químico específico para garantizar que la radiactividad medida está en relación directa con la sustancia problema.

15. Puede obtenerse una estimación de log P_{OW} con ayuda de programas informáticos comerciales para tal fin, o bien aplicando la relación de solubilidades en ambos disolventes.

16. Antes de emprender un ensayo de agitación lenta para la determinación del P_{OW}, es preciso conocer la siguiente información acerca de la sustancia problema:

a) fórmula estructural;

b) métodos analíticos apropiados para determinar la concentración de la sustancia en agua y en 1-octanol;

c) constante(s) de disociación de las sustancias ionizables [Directrices 112 de la OCDE (9)];

d) hidrosolubilidad (10);

e) hidrólisis abiótica (11);

f) biodegradabilidad fácil (12);

g) presión de vapor (13).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Material

17. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— agitadores magnéticos y barras de agitación magnéticas recubiertas de teflón para agitar la fase acuosa;

— instrumental analítico adecuado para determinar la concentración de la sustancia problema a las concentraciones esperadas;

— cubeta de agitación provista de grifo de desagüe. Dependiendo de la estimación del log POW y del límite de detección (LOD) de la sustancia problema, se ha planteado usar un recipiente de reacción de las mismas proporciones pero con capacidad mayor de un litro, con el fin de obtener un volumen de agua suficiente para el análisis y la extracción química. De este modo se obtendrán concentraciones más elevadas en el extracto acuoso y, por ende, una determinación analítica más fiable. En el apéndice 1 figura una tabla que recoge los cálculos del volumen mínimo necesario, el LOD de la sustancia, su log POW estimado y su hidrosolubilidad. La tabla se basa en la relación entre el log POW y el cociente de solubilidades en octanol y agua, tal como ha sido definida por Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

donde:

$SR = S_{oct}/S_w$ (en molaridad);

y en la relación establecida por Lyman (15) para predecir la hidrosolubilidad. Los valores de hidrosolubilidad calculados según la ecuación que se indica en el apéndice 1 deben considerarse una primera estimación. Conviene señalar que el usuario tiene libertad para hacer su propia estimación de la hidrosolubilidad por medio de cualquier ecuación que a su criterio represente mejor la relación entre hidrofobicidad y solubilidad. Cuando se trata de compuestos sólidos, por ejemplo, se recomienda tener en cuenta el punto de fusión en la predicción de la solubilidad. En caso de aplicar una ecuación modificada, habrá que cerciorarse de que sigue siendo válida la ecuación para el cálculo de la solubilidad en octanol. En el apéndice 2 se ha representado esquemáticamente una cubeta de agitación con camisa de vidrio de aprox. un litro de capacidad. Las proporciones del recipiente representado en el apéndice 2 han demostrado ser adecuadas, por lo que deben mantenerse aunque se utilicen recipientes de distinto tamaño;

— es fundamental disponer de algún medio para mantener constante la temperatura durante el ensayo de agitación lenta.

18. Los recipientes serán de material inerte para que la adsorción a sus paredes resulte despreciable.

Preparación de las soluciones del ensayo

19. La determinación del P_{OW} se efectuará con el 1-octanol de la máxima pureza comercialmente disponible (como mínimo + 99 %). Se recomienda purificar el 1-octanol por extracción con ácido, álcali y agua y posterior desecación. Se puede emplear además la destilación para purificar el 1-octanol. El 1-octanol purificado servirá para preparar soluciones patrón de las sustancias problema. En la determinación del P_{OW} se empleará agua destilada procedente de un aparato de cristal o de cuarzo o agua procedente de un sistema de purificación; también se podrá utilizar agua de calidad analítica para CLAR. El agua destilada se habrá filtrado por un filtro de 0,22 μm, y se emplearán blancos para descartar la presencia de impurezas en los extractos concentrados que pudieran interferir con la sustancia problema. Si se emplea un filtro de fibra de vidrio, se limpiará calentándolo en horno a 400 °C durante tres horas como mínimo.

20. Los dos disolventes se habrán saturado recíprocamente antes del ensayo, dejándolos equilibrar en un recipiente con suficiente capacidad. Esto se consigue mediante agitación lenta del sistema bifásico durante dos días.

21. Se tomará una cantidad adecuada de la sustancia problema y se disolverá 1-octanol (saturado con agua). El coeficiente de reparto 1-octanol/agua se ha de determinar en soluciones diluidas en estos dos elementos. Por lo tanto, la concentración de la sustancia problema no debe exceder del 70 % de su solubilidad ni rebasar un máximo de 0,1 M en cualquiera de las fases (1). Las soluciones de 1-octanol empleadas en el ensayo estarán exentas de partículas sólidas de la sustancia problema en suspensión.

22. Se tomará una cantidad adecuada de la sustancia problema y se disolverá en 1-octanol (saturado con agua). Si el log P_{OW} estimado es superior a 5, habrá que cerciorarse de que las soluciones de 1-octanol empleadas en el ensayo están exentas de sustancia problema sólida en suspensión. A tal fin, cuando se analicen compuestos químicos con un log P_{OW} estimado > 5 se seguirá el procedimiento siguiente:

— disolver la sustancia problema en 1-octanol (saturado con agua),

▼M4

— dejar la solución en reposo el tiempo suficiente para que sedimente el material sólido en suspensión; durante la fase de sedimentación, comprobar la concentración de la sustancia problema,

— cuando las concentraciones medidas en la solución de 1-octanol hayan alcanzado valores estables, diluir la solución madre con un volumen adecuado de 1-octanol,

— determinar la concentración de la solución madre diluida. Si la concentración medida es coherente con la dilución, la solución madre diluida se podrá emplear en el ensayo de agitación lenta.

Extracción y análisis de las muestras

23. Para el análisis de la sustancia problema se empleará un método analítico validado. Los investigadores deberán aportar pruebas de que las concentraciones alcanzadas durante el ensayo, tanto en la fase de 1-octanol saturado con agua como en la de agua saturada con 1-octanol, están por encima del límite de cuantificación de los métodos analíticos empleados. Cuando sea necesario aplicar métodos de extracción, habrá que establecer con anterioridad al ensayo las recuperaciones analíticas de la sustancia problema a partir de la fase acuosa y de la fase de 1-octanol. La señal analítica deberá ser corregida con blancos y se extremarán las precauciones para evitar la transferencia del analito de una muestra a otra.

24. Es probable que antes del análisis haya que proceder a la extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico y a la preconcentración del extracto, por cuanto se dan concentraciones excesivamente bajas de las sustancias problema hidrófobas en la fase acuosa. Por la misma razón habrá que reducir las concentraciones que puedan resultar en el blanco. Para este fin es necesario usar disolventes de alta pureza, preferiblemente específicos para análisis de residuos. Por lo demás, el uso de material de vidrio escrupulosamente limpio(por ejemplo, mediante lavado con solvente o calentamiento en horno a alta temperatura) ayudará a evitar la contaminación cruzada.

25. Se puede obtener una estimación del log P_{OW} con ayuda de un programa informático o mediante la valoración de un experto. Si su valor es mayor de seis, habrá que supervisar estrechamente las correcciones con el blanco y las transferencias de analito. Además, si la estimación de log P_{OW} es superior a seis, es obligado el uso de un patrón análogo para corregir los valores de recuperación, a fin de obtener factores de preconcentración elevados. Existen varios programas informáticos comerciales ([1]) para la estimación de log P_{OW}, como Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) y ACD log P (19). En la bibliografía (20-22) se ofrecen descripciones de los métodos de estimación.

26. Los límites de cuantificación (LOQ) para la determinación de la sustancia problema en 1-octanol y agua se establecen sobre la base de métodos aceptados. Como regla general, el límite de cuantificación del método se puede determinar como la concentración en agua o 1-octanol que produce una relación señal/ruido igual a diez. Se elegirá un método adecuado de extracción y preconcentración, además de especificar las recuperaciones analíticas. Se elegirá un factor de preconcentración adecuado a fin de obtener una señal de la intensidad necesaria para la determinación analítica.

([1]) Esta información se facilita exclusivamente para mayor comodidad del usuario. Se pueden utilizar otros programas informáticos siempre que se demuestre que dan lugar a los mismos resultados.

▼M4

27. Sobre la base de los parámetros del método analítico y de las concentraciones esperadas, se determina el tamaño de muestra aproximado que hace falta para determinar con exactitud la concentración de la sustancia. Se evitará emplear muestras de agua demasiado reducidas como para obtener una señal analítica suficiente. Por otro lado, se evitará también el uso de muestras de agua excesivamente voluminosas, pues de otro modo podría quedar una cantidad insuficiente para el número mínimo de análisis que se necesitan (n = 5). En el apéndice 1 se indica el volumen mínimo de muestra en función de la capacidad del recipiente, del LOD de la sustancia problema y de su solubilidad.

28. La cuantificación de las sustancias problema se realiza por comparación con las curvas de calibración del compuesto correspondiente. Las concentraciones halladas en las muestras analizadas deberán estar comprendidas entre las concentraciones de los patrones.

29. En caso de sustancias problema con un log P_{OW} estimado superior a seis, se añadirá un patrón análogo a la muestra de agua antes de la extracción con el fin de registrar las pérdidas ocurridas durante la extracción y la preconcentración de las muestras de agua. Para poder corregir exactamente los valores de recuperación, los análogos deberán tener propiedades muy similares o idénticas a las de la sustancia problema. Con este propósito se usan preferiblemente análogos isotópicamente marcados (estables) de las sustancias de interés (por ejemplo, perdeuterados o marcados con ^{13}C). Cuando no sea posible el uso de isótopos marcados estables, como ^{13}C o ^{2}H, habrá que demostrar con datos fidedignos de la bibliografía que las propiedades fisicoquímicas del análogo son muy semejantes a las de la sustancia problema. Durante la extracción líquido-líquido de la fase acuosa se pueden formar emulsiones. Es posible reducirlas añadiendo una sal y dejando que la emulsión repose hasta el día siguiente. Es preciso documentar los métodos empleados para la extracción y preconcentración de las muestras.

30. Las muestras extraídas de la fase de 1-octanol se pueden, en caso necesario, diluir con un disolvente apropiado antes de su análisis. Por lo demás, se recomienda usar patrones análogos para corregir los valores de recuperación de aquellas sustancias que, en los ensayos de recuperación, han mostrado un alto grado de variabilidad (desviación típica relativa > 10 %).

31. El método analítico se documentará detalladamente. La documentación se refiere a: método de extracción, factores de preconcentración y de dilución, parámetros instrumentales, procedimiento habitual de calibración, intervalo de calibración, recuperación analítica de la sustancia problema a partir del agua, adición de patrones análogos para corregir los valores de recuperación, valores del blanco, límites de detección y límites de cuantificación.

Realización del ensayo

Relación óptima de volúmenes 1-octanol/agua

32. Para decidir qué volúmenes de agua y 1-octanol se van a emplear, hay que tener en cuenta el LOQ en 1-octanol y en agua, los factores de preconcentración aplicados a las muestras acuosas, el volumen de muestreo en 1-octanol y en agua, y las concentraciones esperadas. Por razones experimentales, en el sistema de agitación lenta el volumen de 1-octanol ha de elegirse de manera que la capa de este solvente sea lo bastante espesa (> 0,5 cm) para permitir la toma de muestras de la fase de 1-octanol sin alterarla.

33. En el análisis de compuestos con log P_{OW} de 4,5 o superior, la proporción típica entre fases es de 20 a 50 ml de 1-octanol por 950 a 980 ml de agua en un recipiente de un litro.

▼M4

Condiciones del ensayo

34. Durante el ensayo, el recipiente de reacción se mantiene termostatizado para reducir la variación de temperatura a menos de 1 °C. El ensayo se efectuará a 25 °C.

35. El sistema experimental deberá protegerse de la luz diurna, ya sea procediendo en una sala oscura, ya cubriendo el recipiente de reacción con lámina de aluminio.

36. El ensayo se realizará (en la medida de lo posible) en un ambiente limpio de polvo.

37. El sistema de 1-octanol/agua se agita hasta alcanzar el equilibrio. En un ensayo piloto, se establece la duración del período de equilibrado realizando una operación de agitación lenta y tomando periódicamente muestras de agua y 1-octanol. Los tiempos de muestreo estarán separados por un lapso de cinco horas como mínimo.

38. Cada determinación de P_{OW} se basará al menos en tres ensayos de agitación lenta independientes.

Determinación del tiempo de equilibrado

39. Se supone que se alcanza el equilibrio cuando la curva de regresión del cociente de concentraciones 1-octanol/agua en función del tiempo, representada a lo largo de cuatro momentos de muestreo, arroja una pendiente que no es significativamente diferente de cero a un nivel de p de 0,05. El tiempo de equilibrado será como mínimo un día antes de comenzar el muestreo. Como norma general, el muestreo de sustancias con un log P_{OW} estimado inferior a cinco puede efectuarse durante los días dos y tres. Los compuestos más hidrófobos pueden necesitar un equilibrado más prolongado. En el caso de una sustancia con log P_{OW} de 8,23 (decaclorobifenilo), fueron suficientes 144 horas para llegar al equilibrio. Este se establece mediante muestreo repetido a partir de un único recipiente.

Inicio del ensayo

40. Al iniciar el ensayo, se llena el recipiente de reacción con agua saturada de 1-octanol. Se deja tiempo suficiente hasta alcanzar la temperatura termostatizada.

41. Se toma la cantidad deseada de sustancia problema (disuelta en el volumen necesario de 1-octanol saturado con agua) y se añade cuidadosamente al recipiente de reacción. Este es un paso crucial del ensayo, en el que hay que evitar la mezcla turbulenta de las dos fases. A tal fin, se puede pipetear lentamente la fase de 1-octanol contra la pared del vaso experimental, cerca de la superficie del agua. Acto seguido fluirá por la pared de vidrio para formar una película sobre la fase acuosa. Se evitará en todo caso la decantación del 1-octanol directamente en el matraz; se procurará que no caigan gotas de 1-octanol directamente en el agua.

42. Después de comenzar la agitación, se aumenta suavemente su velocidad. Si no se pudieran ajustar debidamente los motores de agitación habría que considerar el uso de un transformador. La velocidad de agitación se ajusta de modo que se cree un vórtice en la interfase entre el agua y el 1-octanol con una profundidad de 0,5 cm a 2,5 cm como máximo. Si se sobrepasa esta profundidad de 2,5 cm, habrá que reducir la velocidad de agitación; de lo contrario pueden formarse microgotas a partir de las gotitas de 1-octanol en la fase acuosa, lo que llevaría a sobrevalorar la concentración de la sustancia problema en el agua. Esta velocidad de agitación máxima que corresponde a 2,5 cm de profundidad se recomienda teniendo en cuenta los resultados del estudio de validación interlaboratorios (5). Se trata de una solución intermedia entre conseguir un equilibrado rápido y limitar la formación de microgotas de 1-octanol.

▼M4

Muestreo y tratamiento de las muestras

43. Antes de proceder al muestreo, se apaga el agitador y se espera a que los líquidos estén en reposo. Al finalizar el muestro se vuelve a poner en marcha el agitador a velocidad lenta, como se describe anteriormente, y después se aumenta poco a poco la velocidad.

44. Las muestras de la fase acuosa se toman de un grifo ubicado en el fondo del recipiente de reacción. Hay que desechar siempre el volumen muerto de agua contenido en los grifos (alrededor de 5 ml en el recipiente descrito en el apéndice 2). El agua contenida en los grifos no sufre agitación y, por lo tanto, no está en equilibrio con el resto de líquido. Se anota el volumen de las muestras de agua, verificando que la cantidad de sustancia problema presente en el agua desechada se ha tenido en cuenta al determinar el balance de masa. Las pérdidas por evaporación se reducen al mínimo dejando que el agua fluya suavemente por el embudo de decantación, evitando perturbaciones de la capa de agua/1-octanol.

45. Las muestras de 1-octanol se obtienen tomando una pequeña alícuota (aprox. 100 μl) de la capa de 1-octanol con una jeringa de 100 microlitros compuesta enteramente de vidrio y metal. Se procurará no perturbar la superficie de interfase. Se anota el volumen del líquido muestreado. Basta una pequeña alícuota, puesto que la muestra de 1-octanol se va a diluir.

46. Es conveniente evitar transferencias innecesarias de la muestra. Por esta razón el volumen de muestra debe determinarse gravimétricamente. En el caso de las muestras acuosas, esto se consigue recogiéndolas en un embudo de decantación que contenga ya el volumen necesario de disolvente.

DATOS E INFORME

47. En el presente método de ensayo, el P_{OW} se determina a partir de tres ensayos de agitación lenta (tres unidades experimentales) realizados con el compuesto en investigación en idénticas condiciones. La curva de regresión que sirve para demostrar que se ha alcanzado el equilibrio deberá basarse en los resultados de al menos cuatro determinaciones de C_o/C_w correspondientes a momentos de muestreo consecutivos. Ello permite calcular la varianza como medida de la incertidumbre del valor medio obtenido por cada unidad experimental.

48. El P_{OW} queda definido por la varianza de los datos obtenidos por cada unidad experimental. Esta información sirve para calcular el P_{OW} como media ponderada de los resultados de las unidades experimentales individuales. Así, la inversa de la varianza de los resultados obtenidos por las unidades experimentales sirve como factor de ponderación. De este modo los datos con una gran variación (expresada como varianza) y, por ende, con menor fiabilidad, influyen menos en el resultado que los datos con escasa varianza.

49. De manera análoga se calcula la desviación típica ponderada. Refleja la repetibilidad de las mediciones de P_{OW}. Una desviación típica ponderada reducida indica que la determinación del P_{OW} tiene alta repetibilidad dentro del laboratorio. A continuación se expone el tratamiento estadístico formal de los datos.

▼M4

Tratamiento de los resultados

Demostración de que se ha alcanzado el equilibrio

50. Por cada momento de muestreo se calcula el logaritmo del cociente de concentraciones de la sustancia problema en 1-octanol y en agua [log (C_O/C_w)]. Se demuestra que se ha alcanzado el equilibrio químico llevando a una gráfica dicho cociente en función del tiempo. Una meseta en esta gráfica a lo largo de al menos cuatro momentos de medición consecutivos indica que se ha alcanzado el equilibrio, y que el compuesto se ha disuelto realmente en el 1-octanol. De no ser así, habrá que proseguir el ensayo hasta que cuatro puntos de medición consecutivos arrojen una pendiente que no difiera significativamente de cero a un nivel p de 0,05, lo que indica que log C_o/C_w es independiente del tiempo.

Cálculo de log P_{OW}

51. El valor de log P_{OW} de la unidad experimental se calcula como la media ponderada de log C_o/C_w correspondiente a la zona de la curva de log C_o/C_w en función del tiempo en la que se ha demostrado el estado de equilibrio. La media ponderada se calcula ponderando los datos con la inversa de la varianza, de modo que la influencia de los datos en el resultado final sea inversamente proporcional a su incertidumbre.

Media de log P_{OW}

52. Se calcula el valor de log P_{OW} como la media de los resultados de las unidades experimentales individuales ponderados con sus respectivas varianzas.

El cálculo es el siguiente:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

donde:

$\log P_{OW,i}$ = valor de log P_{OW} de la unidad experimental individual i;

$\log P_{OW,Av}$ = media ponderada de las determinaciones de log P_{OW} individuales;

w_i = peso estadístico atribuido al valor de log P_{OW} de la unidad experimental i.

Como w_i se toma la inversa de la varianza de log $P_{OW,i}$ ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Se estima el error de la media de log P_{OW} como la repetibilidad de log C_o/C_w determinado durante la fase de equilibrio en las unidades experimentales individuales. Este se expresa como la desviación típica ponderada de log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), que a su vez da una medida del error asociado a log $P_{OW,Av}$. La desviación típica ponderada se puede calcular a partir de la varianza ponderada ($var_{\log Pow,Av}$) del modo siguiente:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Donde n representa el número de unidades experimentales.

▼M4

Informe del ensayo

54. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador si se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 17),

— pureza (impurezas) de la sustancia problema,

— pureza radioquímica de las sustancias marcadas y actividad molar (si procede),

— estimación preliminar de log POW, además del método aplicado para obtener su valor.

Condiciones del ensayo:

— fechas de realización de los estudios,

— temperatura durante el ensayo,

— volúmenes de 1-octanol y agua al inicio del ensayo,

— volúmenes de las muestras tomadas de 1-octanol y agua,

— volúmenes de 1-octanol y agua que quedan en los recipientes de ensayo,

— descripción de los recipientes de ensayo y las condiciones de agitación (dimensiones de la barra agitadora y del recipiente de ensayo, altura del vórtice en mm y, cuando se conozca, velocidad de agitación) empleadas,

— procedimientos analíticos aplicados para determinar la sustancia problema y el límite de cuantificación del método,

— tiempos de muestreo,

— pH de la fase acuosa y soluciones amortiguadoras empleadas cuando se ajusta el pH (en caso de moléculas ionizables),

— número de réplicas.

Resultados:

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— concentraciones medidas de la sustancia problema en 1-octanol y en agua en función del tiempo,

— demostración del balance de masa,

— temperatura y desviación típica o intervalo de temperaturas durante el ensayo,

— recta de regresión del cociente de concentraciones en función del tiempo,

— valor medio de log $P_{ow,Av}$ y su error típico,

— discusión e interpretación de los resultados,

▼M4

— ejemplos de datos en bruto de los análisis representativos (todos los datos en bruto tienen que almacenarse de conformidad con las normas de BPL), entre ellos los índices de recuperación de los análogos y el número de concentraciones tomadas para la calibración (además de los criterios para definir el coeficiente de correlación de la curva de calibración), y resultados de garantía de calidad/control de calidad (QA/QC),

— cuando estén disponibles: informe de validación del método de ensayo (con indicación de su referencia bibliográfica).

BIBLIOGRAFÍA:

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Capítulo A.8 del presente anexo. Coeficiente de reparto.

(3) Capítulo A.8 del presente anexo. Coeficiente de reparto.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (POW) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. Environ. Sci. Technol. 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Capítulo A.6 del presente anexo. Hidrosolubilidad.

(11) Capítulo C.7 del presente anexo. Degradación — Degradación abiótica: hidrólisis en función del pH.

(12) Capítulo C.4-Partes II – VII (métodos A a F) del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

(13) Capítulo A.4 del presente anexo. Presión de vapor.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, J. Chem. Eng. Data. 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, Handbook of chemical property estimation, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 14: 479-488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, Methoden der Organischen Chemie: 386-390.

▼M4

Apéndice 1

Hoja para el cálculo de los volúmenes mínimos de agua necesarios para la detección de sustancias problema con diferentes valores de log P_{OW} en fase acuosa

Hipótesis:

— Volumen máximo de las alícuotas individuales = 10 % del volumen total; 5 alícuotas = 50 % del volumen total.

— Concentraciúndelassustanciasproblema $= 0,7 \times$ solubilidadencadafase. Si las concentraciones son más bajas, se necesitarán volúmenes mayores.

— Volumen empleado para la determinación del LOD = 100 ml.

— Las correspondencias entre log P_{ow} y log S_w y entre log P_{ow} y SR (S_{oct}/S_w) expresan aceptablemente las relaciones que se dan en las sustancias problema.

Estimación de S_w

log P_{ow}	Ecuación	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–3,192	6,427E-04

Estimación de S_{oct}

log P_{ow}	Ecuación	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Masa total de sustancia problema (mg)	$Masa_{oct}/Masa_{agua}$	$Masa_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Masa_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Cálculo de los volúmenes

Volumen mínimo de fase acuosa necesario por cada concentración límite de detección

$\log K_{ow}$	LOD (microgramos/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volumen empleado para determinar el LOD (litros)	0,1					

Leyendas de los cálculos:

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 1 litro.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 2 litros.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 5 litros.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 10 litros.

Sobrepasa incluso el 10 % del recipiente de equilibrado de 10 litros.

▼**M4**

Representación de los volúmenes necesarios en función de la hidrosolubilidad y del log P_{ow}

Volumen mínimo de fase acuosa necesario por cada concentración límite de detección (ml)

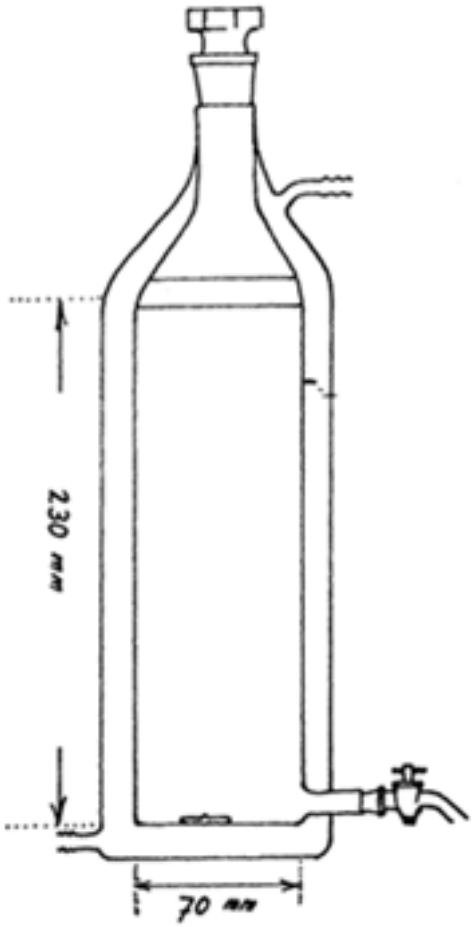
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgramos/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgramos/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volumen empleado para determinar el LOD (litros)		0,1					

Apéndice 2

Ejemplo de recipiente con camisa de vidrio empleado en el ensayo de agitación lenta para la determinación del P_{ow}



▼B

ANEXO

PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD Y OTROS EFECTOS SOBRE LA SALUD

ÍNDICE

	INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B
B.1 bis.	TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE DOSIS FIJAS
B.1 ter.	TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA
B.2.	TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN
B.3.	TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA
B.4.	TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA
B.5.	TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR
B.6.	SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL
B.7.	TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) EN ROEDORES
B.8.	TOXICIDAD SUBAGUDA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 28 DÍAS
B.9.	TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) VÍA CUTÁNEA
B.10.	MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS *IN VITRO* EN MAMÍFEROS.
B.11.	MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS *IN VIVO* EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFEROS
B.12.	MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*
B.13/14.	MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN INVERSA EN BACTERIAS
B.15.	ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS Y DETECCIÓN DE CARCINOGÉNESIS -MUTACIÓN GÉNICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
B.16.	RECOMBINACIÓN MITÓTICA — SACCHAROMYCES CEREVISIAE
B.17.	MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*
B.18.	LESIÓN Y REPARACIÓN DE DNA — SÍNTESIS DE DNA NO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*
B.19.	ENSAYO *IN VITRO* DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS
B.20.	ENSAYO DE LETALIDAD RECESIVA LIGADA AL SEXO EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21. ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

B.22. ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES

B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIAS DE MAMÍFERO

B.24. ENSAYO DE LA MANCHA EN EL RATÓN

B.25. TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN

B.26. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA — TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN ROEDORES

B.27. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA — TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN NO ROEDORES

B.28. TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA — ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

B.29. TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 90 DÍAS

B.30. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

B.31. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA EL DESARROLLO PRENATAL

B.32. ENSAYO DE CARCINOGÉNESIS

B.33. ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS

B.34. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

B.35. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

B.36. TOXICOCINÉTICA

B.37. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA

B.38. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS. ESTUDIO POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE 28 DÍAS

B.39. ENSAYO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS) EN HEPATOCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO:* ENSAYO DE RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÁNEA (RET)

B.40 BIS. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO:* ENSAYO CON MODELO DE PIEL HUMANA

▼**B**

B.41. ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD *IN VITRO* 3T3 ARN (ABSORCIÓN DE ROJO NEUTRO)

B.42. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES

B.43. ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD EN ROEDORES

B.44. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VIVO*

B.45. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VITRO*

B.46. IRRITACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO:* MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA

B.47. MÉTODO DE ENSAYO DE LA OPACIDAD Y PERMEABILIDAD DE LA CÓRNEA DE BOVINO PARA DETECTAR AGENTES CORROSIVOS E IRRITANTES INTENSOS PARA LOS OJOS

B.48. MÉTODO DE ENSAYO DE OJO DE POLLO AISLADO PARA DETECTAR AGENTES CORROSIVOS E IRRITANTES INTENSOS PARA LOS OJOS

B.49. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

B.50. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: DA

B.51. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: BrdU-ELISA

▼**M4**

B.52. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

▼B

INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B

A. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Antes de iniciar cualquier estudio de toxicidad debe conocerse la composición de la sustancia de ensayo, con inclusión de las impurezas principales, y sus propiedades fisicoquímicas pertinentes, incluida la estabilidad.

Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de ensayo proporcionan datos importantes para la selección de la vía de administración, el diseño de cada estudio particular y el manejo y almacenamiento de la sustancia.

Antes de iniciarse el estudio debe, desarrollarse un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sustancia de ensayo (con inclusión de sus principales impurezas, siempre que sea posible) en el medio de administración y en el material biológico.

Debe incluirse en el informe del ensayo toda la información a la identificación, propiedades fisicoquímicas, pureza y comportamiento de la sustancia estudiada,

B. CUIDADOS DE LOS ANIMALES

En los estudios de toxicidad es fundamental controlar de forma estricta las condiciones ambientales y aplicar técnicas adecuadas de cuidado de los animales.

i) *Condiciones de alojamiento*

Las condiciones ambientales de los ¡ocales o recintos destinados a los animales de experimentación deben ser adecuadas para la especie que se utilice. Para ratas, ratones y cobayas, la temperatura del local debe ser de 22 ± 3 ºC, con una humedad relativa del 30 al 70 %; para los conejos, la temperatura debe ser de 20 ± 3 ºC, con una humedad relativa del 30 al 70 %.

Algunas técnicas experimentales son particularmente sensibles a ¡os efectos de la temperatura; en tales casos, en la descripción del método de ensayo se incluyen indicaciones detalladas sobre las condiciones apropiadas. En todas las investigaciones sobre efectos tóxicos deben medirse y registrarse la temperatura y la humedad, y estos parámetros deben consignarse en el informe final del estudio.

La iluminación debe ser artificial, con una alternancia de 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.

Salvo que el método contenga alguna indicación en contra, los animales se alojarán individualmente, o estarán en jaulas de pequeños grupos del mismo sexo, En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de 5 animales en cada jaula.

En los informes sobre los experimentos 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 la sustancia química como durante el período posterior de observación.

▼B

ii) *Condiciones de alimentación*

La dieta debe cubrir todas ¡as necesidades nutricionales de la especie sometida a experimentación. Cuando se incorporen sustancias de ensayo a la dieta de los animales, el valor nutricional puede verse reducido por interacciones entre la sustancias y algún componente de la dieta. A la hora de interpretar los resultados de los ensayos debe estudiarse la posibilidad de que se dé una interacción de este tipo. Pueden utilizarse dietas convencionales de laboratorio junto con un aporte ilimitado de agua potable. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia estudiada si se administra por este método.

Ningún contaminante de la dieta con influencia conocida sobre la toxicidad podrá estar presente en concentraciones que puedan interferir.

C. **ENSAYOS ALTERNATIVOS**

Constituye un objetivo científico de la Unión Europea la elaboración y validación de técnicas alternativas que puedan proporcionar el mismo nivel de información que los actuales ensayos con animales, pero utilizando menos animales, provocando menos sufrimiento o evitando completamente el uso de animales.

Tales métodos, según vayan existiendo, deben tenerse en cuenta siempre que sea posible para la caracterización de riesgos y la correspondiente clasificación y etiquetado en función de los riesgos intrínsecos.

D. **EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN**

A la hora de evaluar e interpretar los ensayos, deben tenerse en cuenta las limitaciones de la extrapolación directa al hombre de los resultados de los estudios realizados *in vitro* o con animales y, en consecuencia, deben utilizarse pruebas de la aparición de efectos adversos en personas, siempre que sea posible, a fin de confirmar los resultados de los ensayos.

E. **REFERENCIAS**

La mayoría de estos métodos se han elaborado en el marco del programa de la OCDE de líneas directrices de ensayo, y deben realizarse de conformidad con los principios de buenas prácticas de laboratorio, a fin de garantizar la «aceptación mutua de datos» lo más amplia posible.

Puede encontrarse información adicional en las referencias que se dan en las directrices de la OCDE y en otras publicaciones relacionadas.

▼B

B.1 *BIS.* TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE DOSIS FIJAS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 420 (2001).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales para evaluar la toxicidad aguda utilizan la muerte de los animales como parámetro. En 1984 la British Toxicology Society propuso un nuevo enfoque de los ensayos de toxicidad aguda basado en la administración de una serie de dosis fijas (1) Este enfoque evitaba recurrir a la muerte de los animales como parámetro y se basaba, en cambio, en la observación de signos claros de toxicidad a un nivel determinado de una serie de dosis fijas. Tras una serie de estudios de validación *in vivo* británicos (2) e internacionales (3), este procedimiento fue adoptado como método de ensayo en 1992. Posteriormente, se han evaluado las propiedades estadísticas del método de dosis fijas utilizando modelos matemáticos en una serie de estudios (4) (5) (6). Conjuntamente, los estudios *in vivo y* los basados en modelos han demostrado que el procedimiento es reproducible, requiere menos animales y causa menos sufrimiento que los métodos tradicionales. Al mismo tiempo, permite clasificar las sustancias de manera parecida a los otros métodos de ensayo de toxicidad aguda.

En el *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (7) se dan directrices sobre la selección del método de ensayo más adecuado en función del objetivo. Además, en este documento orientativo se facilita información complementaria sobre la realización e interpretación del método de ensayo B.1*bis*.

Es un principio del método que en el estudio principal solo se empleen dosis moderadamente tóxicas y que se evite la administración de dosis que se prevean letales. Asimismo, no es necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados por sus efectos corrosivos o muy irritantes. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo serán sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En otro documento orientativo (8) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

El método aporta información sobre las propiedades peligrosas y permite clasificar las sustancias de acuerdo con el Sistema Armonizado Mundial (SAM) [Globally Harmonised System (GHS)] de clasificación de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (9)

El laboratorio que haga los ensayos debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia estudiada antes de llevar a cabo la prueba. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros ensayos de toxicidad *in vitro o in vivo,* los datos toxicológicos sobre otras sustancias estructuralmente relacionadas, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los afectados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana y ayuda a la selección de una dosis inicial adecuada.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Toxicidad oral aguda: efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas dentro de un período de 24 horas.

Muerte retardada significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el período de observación de 14 días.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. La dosis se expresa en peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal sometido al experimento (por ejemplo, mg/kg).

Toxicidad manifiesta es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de una sustancia [véanse ejemplos en (3)]. de tal manera que a la dosis fija inmediatamente superior pueden preverse en la mayoría de los animales dolores fuertes y signos continuados de sufrimiento grave, agonía [véanse los criterios al respecto en *Humane Endpoints Guidance Document* (8)] o muerte probable.

SAM: Sistema Armonizado Mundial [*Globally Harmonised System* (GHS)] de clasificación y etiquetado de productos químicos. Actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), el Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas (propiedades físico-químicas) y la OIT (comunicación de peligros), coordinada por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de Sustancias Químicas (IOMC, en sus siglas inglesas).

Muerte inminente: fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación previsto. Entre los signos que indican esta situación en los roedores cabe citar: convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. [Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información].

DL50 **(dosis letal mediana):** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. El valor de la DL_{50} se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (mg/kg).

Dosis límite: dosis del límite máximo del ensayo (2 000 o 5 000 mg/kg).

Agonía: situación en la que el animal se está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento. [Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información].

Muerte previsible: presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua. [Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información].

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administran de manera gradual a grupos de animales de un solo sexo dosis fijas de 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg (excepcionalmente podría considerarse una dosis adicional de 5 000 mg/kg, véase el punto 1.6.2). La dosis inicial se determina basándose en un estudio preliminar y consiste en la que se prevé que produzca ciertos signos de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves ni mortalidad. En un documento orientativo aparte de la OCDE (8) se describen de manera detallada las afecciones y los signos clínicos que denotan dolor, sufrimiento y muerte inminente. Pueden darse dosis más altas o más bajas a otros grupos de animales según la presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad. Este procedimiento continúa hasta que se determina la dosis que causa toxicidad manifiesta o solo una muerte o cuando no se observan efectos a la dosis más alta o cuando ocurren muertes a la dosis más baja.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se emplean hembras (7). Se hace así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de DL_{50} muestra que normalmente hay poca diferencia en cuanto a sensibilidad entre los sexos, pero, en los casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles (10). Sin embargo, si se conocen propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que es probable que los machos sean más sensibles, deberá utilizarse este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente.

Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El animal, al inicio de la administración de la sustancia, debe tener entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo del ± 20 % del peso medio de los animales a los que previamente se haya administrado la sustancia.

1.4.2. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ºC (± 3 ºC). Aunque la humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede darse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

1.4.3 **Preparación de los animales**

Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar la administración de la sustancia, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

▼B

1.4.4 **Preparación de las dosis**

En general, las sustancias estudiadas deben administrarse en un volumen constante para toda la gama de dosis que deban ensayarse, variando la concentración del preparado administrado. Sin embargo, cuando deba administrarse una mezcla o producto final líquidos, puede resultar más adecuado para la posterior evaluación de riesgos utilizar la sustancia no diluida, es decir, a una concentración constante. Algunas autoridades reguladoras establecen este criterio con carácter obligatorio. En cualquiera de los dos casos, no debe superarse el volumen de dosis máximo. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. En los roedores, el volumen no debe sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, de las que se pueden usar 2 ml/100 g de peso corporal. En cuanto a la formulación del preparado que se administre, se recomienda el uso de una solución/suspensión/emulsión acuosa siempre que sea posible, seguida, en orden de preferencia, por una solución/suspensión/emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca la estabilidad del preparado durante el período en que se vaya a utilizar y conste que esta sea aceptable.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 **Administración de las dosis**

La sustancia estudiada se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o cánula adecuada de intubación. Cuando se dé el caso, poco habitual, de que no pueda administrarse una dosis única, se podrá dividir esta en partes más pequeñas durante un período que no sobrepase las 24 horas.

Los animales se mantendrán en ayunas antes de la administración de la dosis (por ejemplo, las ratas no deberán recibir alimento alguno durante la noche, pero sí agua). Los ratones no deberán ser alimentados durante 3-4 horas, pero podrán beber agua). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada esta, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 o 4 horas en el caso de las ratas y 1 o 2 horas cuando se trate de ratones. Cuando una dosis se administre en fracciones a lo largo de un período, podrá ser necesario proporcionar a los animales alimento y agua, en función de la duración del período.

1.5.2 **Estudio preliminar**

La finalidad del estudio preliminar es determinar la dosis inicial adecuada para el estudio principal. La sustancia estudiada se administra a cada animal de manera secuencial según lo indicado en los gráficos del anexo 1. El estudio preliminar se considera terminado cuando puede tomarse una decisión sobre la dosis inicial para el estudio principal (o si se observa una muerte a la dosis fija más baja)

La dosis inicial para el estudio preliminar se selecciona a partir de los niveles de dosis fija de 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg y consiste en la dosis que se prevé que produzca toxicidad manifiesta, basándose, cuando sea posible, en datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* referentes a la misma sustancia química y a otras sustancias estructuralmente relacionadas. A falta de esta información, la dosis inicial será de 300 mg/kg.

Se dejará transcurrir un plazo mínimo de 24 horas entre las administraciones de dosis a cada animal. El período de observación de todos los animales debe ser de, al menos, 14 días.

▼B

Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otra dosis fija superior de 5 000 mg/kg (véase el anexo 3). Por razones de bienestar animal, se desaconseja el ensayo de sustancias de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (DL_{50} entre 2 000-5 000 mg/kg) con animales. Este ensayo solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal o del medio ambiente.

En los casos en que se ensaye en un animal la dosis fija más baja (5 mg/kg) en un estudio preliminar y el animal muera, el procedimiento normal es poner fin al estudio y asignar la sustancia a la categoría 1 del SAM (tal como se indica en el anexo 1). Sin embargo, si se requiere confirmar la clasificación, puede seguirse un procedimiento opcional complementario, que se indica a continuación. Se administra a otro animal una dosis de 5 mg/kg. Si este muere, queda confirmada la categoría 1 del SAM y se pone fin al estudio inmediatamente. Si el segundo animal sobrevive, se administra una dosis de 5 mg/kg a otros tres animales. Dado que habrá un riesgo elevado de mortalidad, los animales recibirán la dosis de manera secuencial para proteger el bienestar animal. El intervalo entre la administración de la dosis a cada animal debe ser suficiente para que quede claro que el animal anterior tiene probabilidades de sobrevivir. Si ocurre una segunda muerte, se pondrá fin inmediatamene a la administración de dosis, y no se dará la sustancia a ningún otro animal. Dado que el hecho de que se produzca una segunda muerte (independientemente del número de animales sometidos a ensayo en el momento de la terminación) corresponde al resultado A (2 o más muertes), se seguirá la norma de clasificación del anexo 2 a la dosis fija 5 mg/kg (categoría 1 si hay dos o más muertes o categoría 2 si solo hay una muerte). Además, el anexo 4 da orientaciones sobre la clasificación en el sistema comunitario hasta que se aplique el nuevo SAM.

1.5.3 **Estudio principal**

1.5.3.1 *Número de animales y dosis*

La actuación que debe seguirse tras el ensayo al nivel de dosis inicial se indica en los gráficos del anexo 2. Deberá optarse por una de las tres actuaciones siguientes: terminar el ensayo y asignar a la sustancia la categoría de peligro adecuada, ensayar a una dosis fija superior o ensayar a una dosis fija inferior. Sin embargo, para proteger a los animales, no se repetirá en el estudio principal ningún nivel de dosis que haya causado un resultado de muerte en el estudio preliminar (véase el anexo 2). La experiencia ha mostrado que el resultado más probable al nivel de dosis inicial es que pueda clasificarse la sustancia y que no sean necesarios más ensayos.

Para cada nivel de dosis investigado se utilizará normalmente un total de cinco animales de un mismo sexo. Este grupo de cinco animales estará compuesto de un animal del estudio preliminar al que se haya administrado la sustancia al nivel de dosis seleccionado más otros cuatro (excepto cuando un nivel de dosis utilizado en el estudio principal no estuviera incluido en el estudio preliminar, situación que es poco frecuente).

El intervalo de tiempo entre la administración de dosis a cada nivel se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de animales con la dosis siguiente no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados. Se recomienda, si es necesario, un período de tres o cuatro días entre la administración de cada nivel de dosis para poder observar la toxicidad retardada. Este intervalo puede ajustarse según convenga, por ejemplo en caso de respuestas no concluyentes.

▼B

Cuando se emplee una dosis fija superior de 5 000 mg/kg, se seguirá el procedimiento indicado en el anexo 3 (véase también el punto 1.6.2).

1.5.3.2 *Ensayo límite*

El ensayo límite se utiliza principalmente en situaciones en las que el experimentador tiene información de que la sustancia estudiada es probable que no sea tóxica, es decir, solo resulta tóxica por encima de las dosis límite reglamentarias. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos, mezclas o productos ensayados semejantes, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en la que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

Utilizando el procedimiento normal, una dosis inicial en el estudio preliminar de 2 000 mg/kg (o excepcionalmente 5 000 mg/kg) seguida por la administración de este nivel de dosis a cuatro animales sirve de ensayo límite para las presentes directrices.

1.6 OBSERVACIONES

Tras la administración de la dosis, se observan los animales uno por uno, al menos una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención durante las primeras 4 horas, y a continuación diariamente, a lo largo de un total de 14 días, excepto cuando tengan que eliminarse del estudio y sacrificarse de manera compasiva por razones de bienestar animal o bien cuando resulten muertos. Sin embargo, no debe fijarse rígidamente la duración de la observación, sino que esta debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos (11). Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en una ficha de cada animal.

Será necesario proceder a observaciones adicionales si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad locomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso o signos continuos de sufrimiento intenso deberán sacrificarse de forma compasiva. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

1.6.1 **Peso corporal**

Cada animal se pesará justo antes de la administración de la sustancia, y después al menos una vez por semana. Se calcularán y registrarán los cambios de peso. Al final de la prueba, los animales supervivientes se pesarán antes de sacrificarse de forma compasiva.

▼B

1.6.2 **Patología**

Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a necropsia macroscópica. Se registrarán los cambios patológicos macroscópicos de cada animal. Podrá considerarse también la realización del examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica en los animales que sobrevivan un mínimo de 24 horas después de la administración de la dosis inicial, ya que este examen puede proporcionar información útil.

2 **RESULTADOS**

Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, se reunirán todos los resultados en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la necropsia.

3 **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Sustancia estudiada:

— naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización),

— identificación química, incluido el número CAS.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número, edad y sexo de los animales (incluida, cuando proceda, una justificación del uso de machos en vez de hembras),

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones de ensayo:

— información sobre la formulación de la sustancia de ensayo, incluida la forma física del material administrado,

— datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración,

— datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluido el origen/tipo de la dieta y el origen del agua),

— justificación de la elección de la dosis inicial.

▼B

Resultados:

— tabulación de las respuestas y los niveles de dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluida la mortalidad, naturaleza, gravedad y duración de los efectos),

— tabulación del peso corporal y los cambios en el mismo,

— peso de cada animal el día en que se administre la dosis, posteriormente a intervalos semanales, y en el momento de la muerte o el sacrificio,

— fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio previsto,

— cronología de la aparición de signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal,

— observaciones de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados.

Conclusiones.

4 **REFERENCIAS**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxico]., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482 (3).

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol., 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 -196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

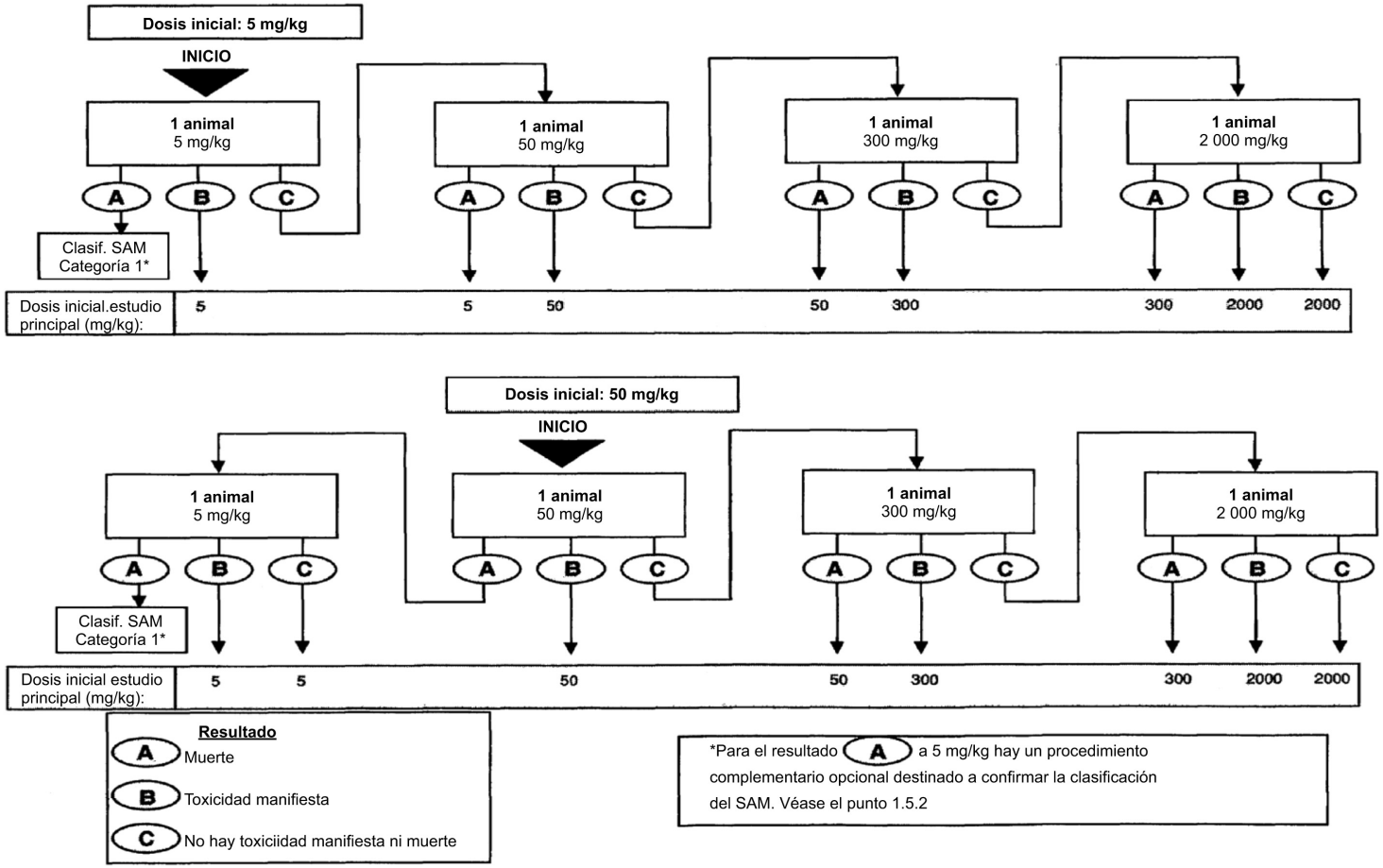
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygenera]/0,3380JEN- documents-521 -14-no-24-no-0,FF.htmI].

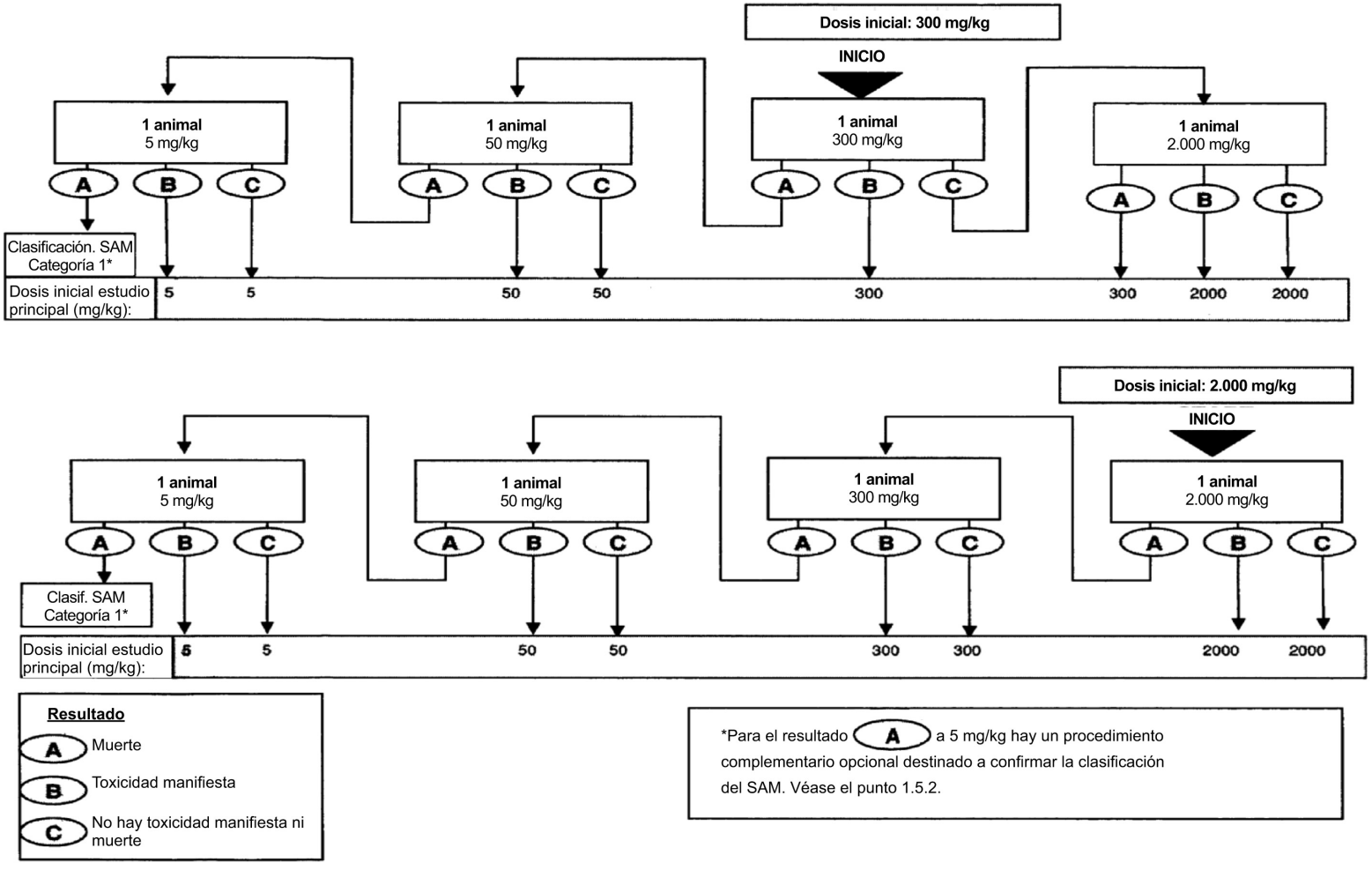
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, in: Principies and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA

ANEXO 1

DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRELIMINAR

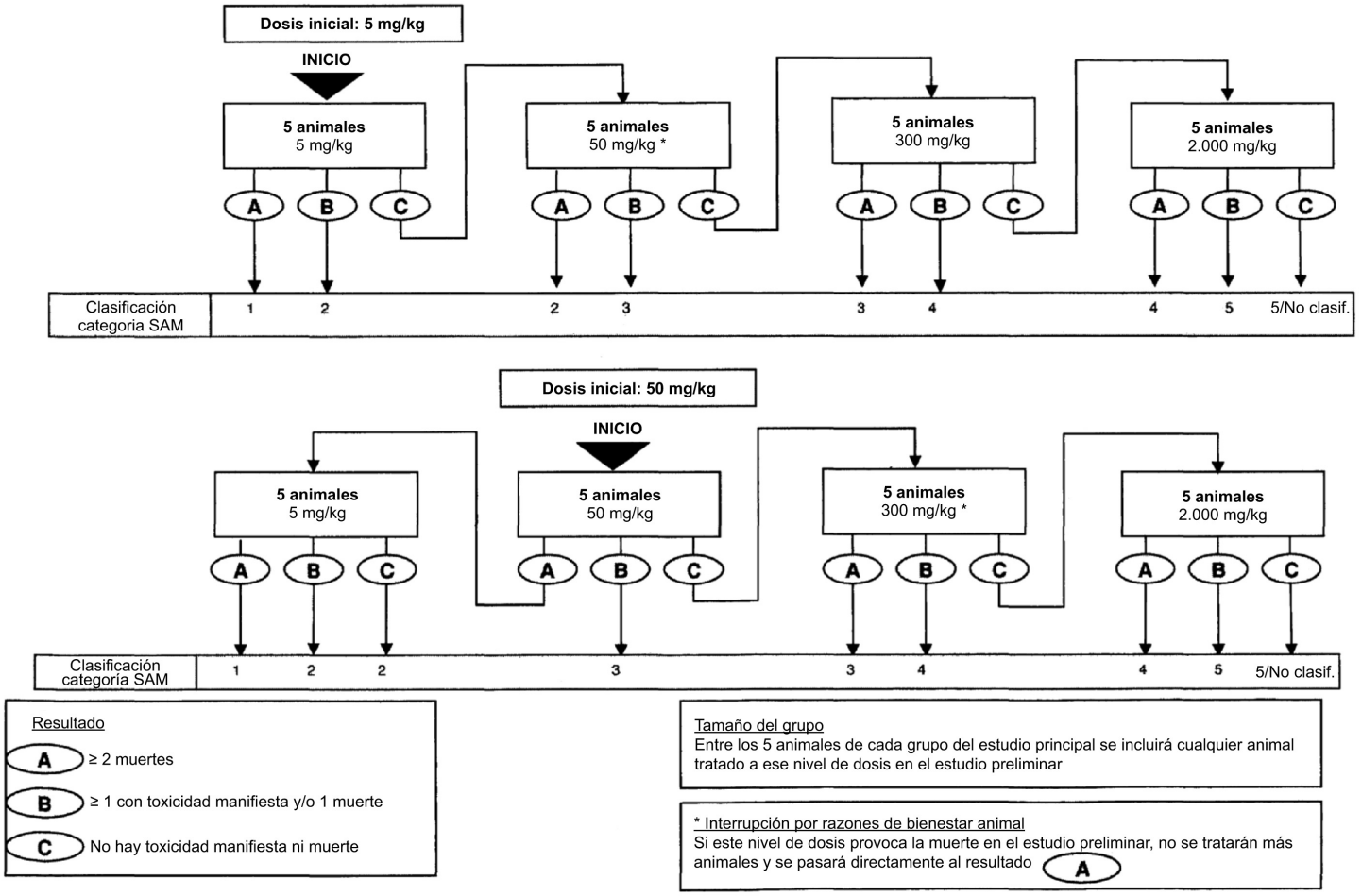



Dosis inicial: 300 mg/kg
INICIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2.000 mg/kg
A
B
C
Clasificación. SAM
Categoría 1*
Dosis inicial estudio
principal (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Dosis inicial: 2.000 mg/kg
INICIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2.000 mg/kg
Clasif. SAM
Categoría 1*
Dosis inicial estudio
principal (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Resultado
A Muerte
B Toxicidad manifiesta
C No hay toxicidad manifiesta ni muerte
*Para el resultado A a 5 mg/kg hay un procedimiento complementario opcional destinado a confirmar la clasificación del SAM. Véase el punto 1.5.2.

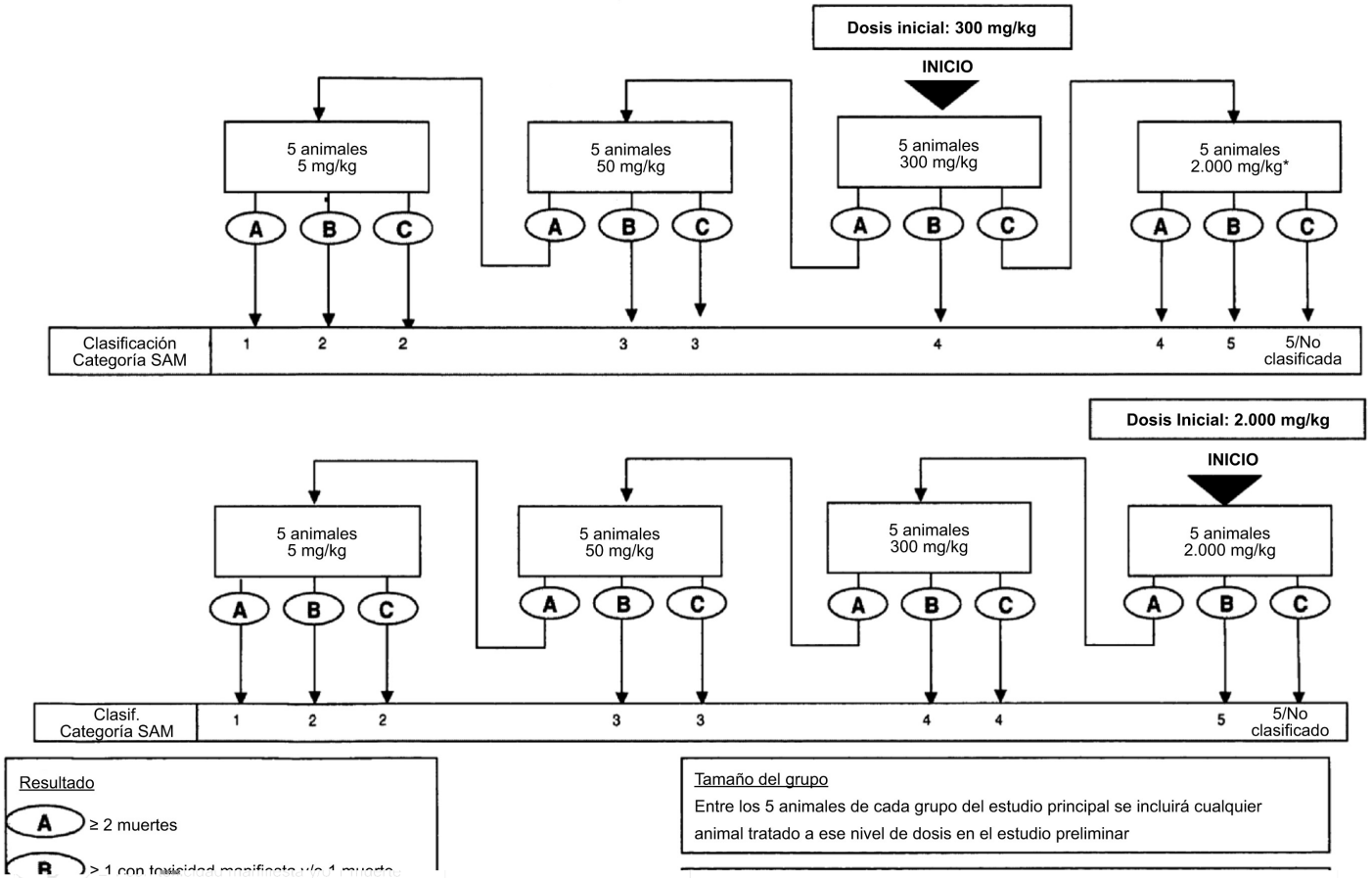
▼B

ANEXO 2

DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRINCIPAL



▼B


Dosis inicial: 300 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg*
A B C
Clasificación Categoría SAM
1 2 2 3 3 4 4 5 5/No clasificada
Dosis Inicial: 2.000 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg
Clasif. Categoría SAM
1 2 2 3 3 4 4 5 5/No clasificado
Resultado
A ≥ 2 muertes
B ≥ 1 con toxicidad manifiesta y/o 1 muerte
C No hay toxicidad manifiesta ni muerte
Tamaño del grupo
Entre los 5 animales de cada grupo del estudio principal se incluirá cualquier animal tratado a ese nivel de dosis en el estudio preliminar
* Interrupción por razones de bienestar animal
Si este nivel de dosis provoca la muerte en el estudio preliminar, no se tratarán más animales y se pasará directamente al resultado A

▼B

ANEXO 3

CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS CON VALORES DL_{50} PREVISTOS SUPERIORES A LOS 2 000 MG/KG SIN NECESIDAD DE ENSAYO

Los criterios de la categoría de peligro 5 tienen por objeto permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que, en determinadas circunstancias, puedan representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una DL_{50} oral o dérmica dentro del intervalo 2 000-5 000 mg/kg o dosis equivalentes por otras vías. Las sustancias estudiadas podrían clasificarse en la categoría de peligro definida por: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (categoría 5 del SAM), en los siguientes casos:

a) cuando cualquiera de los esquemas de ensayo del anexo 2 lleve a esta categoría, basándose en las cifras de mortalidad;

b) cuando se disponga ya de datos fiables que indiquen que la DL_{50} se sitúa dentro del intervalo de los valores de la categoría 5 o cuando otros estudios con animales o los efectos tóxicos observados en las personas indiquen un peligro agudo para la salud humana;

c) mediante extrapolación, estimación o medición de datos si no está justificada la clasificación en una categoría más peligrosa, y

   — se dispone de información fiable que indique la existencia de efectos tóxicos significativos en los seres humanos, o

   — se observe mortalidad cuando se efectúen ensayos hasta la categoría 4 por vía oral, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen que se dan signos clínicos significativos de toxicidad al efectuar ensayos hasta los valores de la categoría 4, excepto en el caso de diarrea, piloerección o aspecto despeinado, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen información fiable obtenida a partir de otros estudios con animales que indique un potencial de efectos agudos significativos.

ENSAYOS A DOSIS SUPERIORES A 2 000 MG/KG

Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otro nivel de dosis fija superior de 5 000 mg/kg Reconociendo la necesidad de proteger el bienestar animal, se desaconseja el ensayo a la dosis 5 000 mg/kg. Este solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal (9).

Estudio preliminar

Las normas para la toma de decisiones que rigen el procedimiento secuencial del anexo 1 se amplían de manera que incluyan el nivel de dosis 5 000 mg/kg Por tanto, cuando se emplee una dosis inicial en el estudio preliminar de 5 000 mg/kg, el resultado A (muerte) obligará a que se haga un ensayo con otro animal a 2 000 mg/kg; los resultados B y C (toxicidad manifiesta o no toxicidad) permitirán la selección de la dosis de 5 000 mg/kg como dosis inicial del estudio principal. De la misma manera, si se utiliza una dosis inicial distinta de 5 000 mg/kg se pasará a la de 5 000 mg/kg en caso de que se den los resultados B o C a 2 000 mg/kg; un posterior resultado A a 5 000 mg/kg determinará una dosis inicial para el estudio principal de 2 000 mg/kg y los resultados B y C determinarán una dosis inicial para el estudio principal de 5 000 mg/kg.

▼B

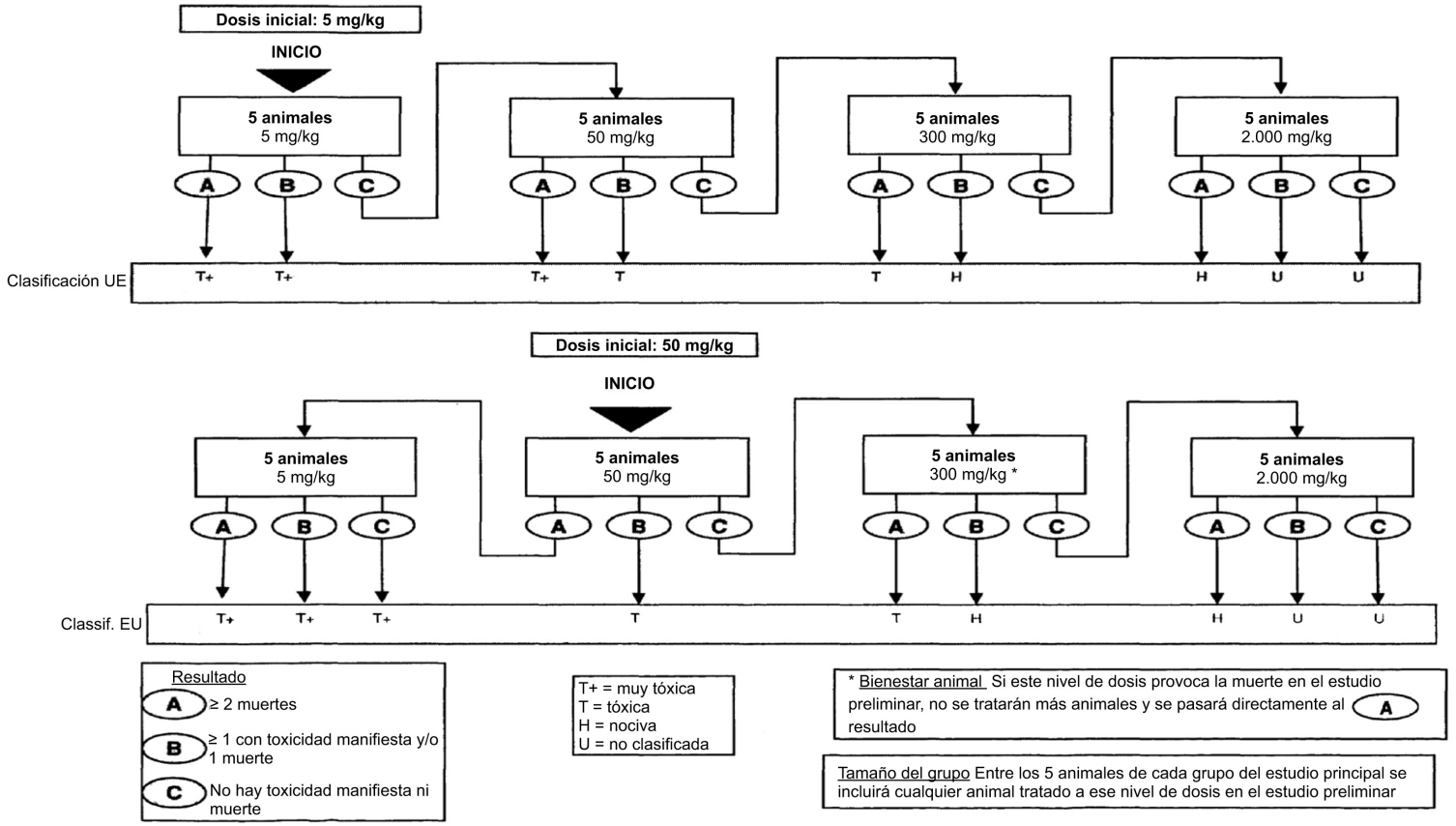
Estudio principal

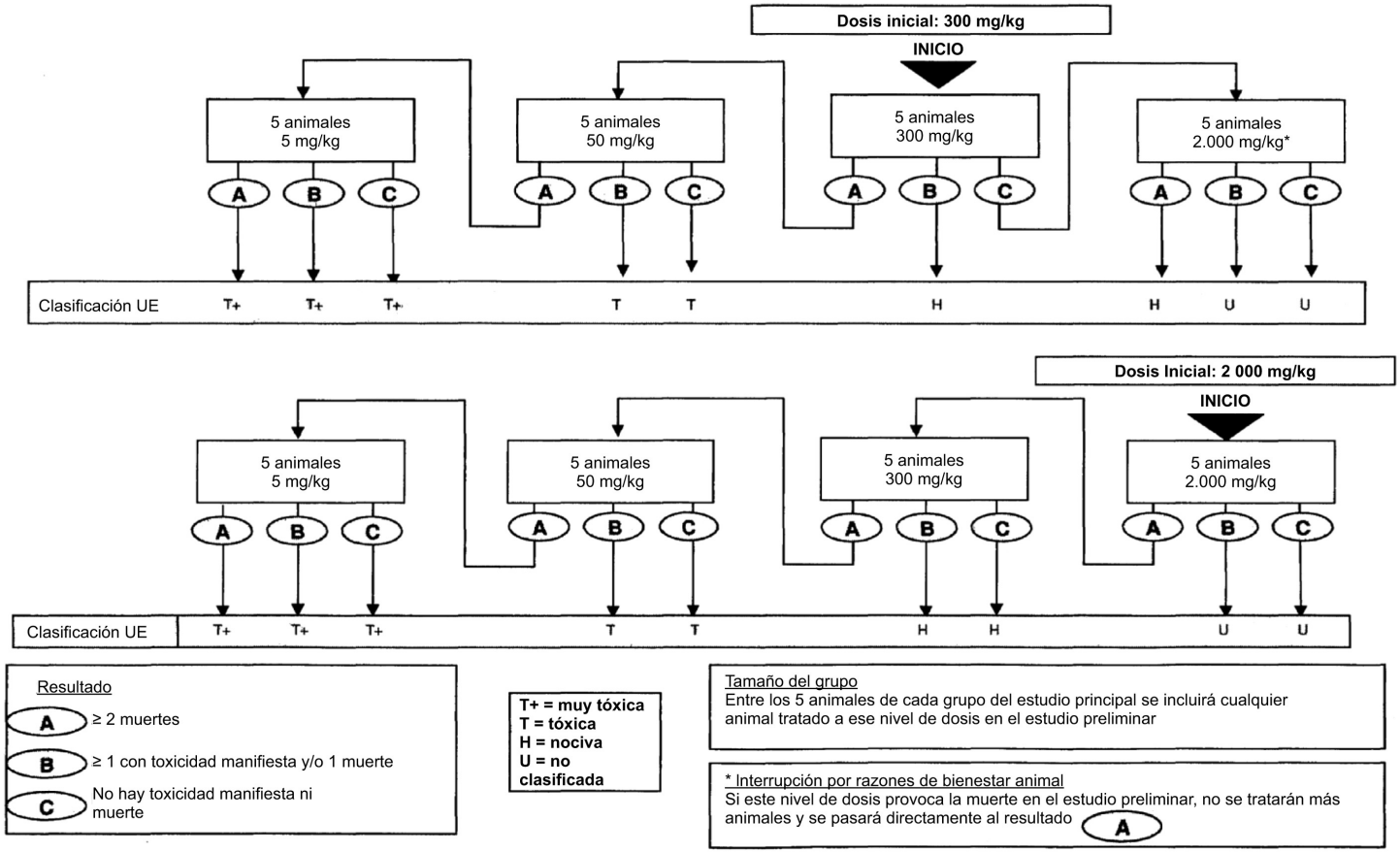
Las normas para la toma de decisiones que rigen el procedimiento secuencial del anexo 2 se amplían de manera que incluyan el nivel de dosis de 5 000 mg/kg. Por tanto, cuando se emplee una dosis inicial en el estudio principal de 5 000 mg/kg, el resultado A (> 2 muertes) obligará a que se haga un ensayo con un segundo grupo a 2 000 mg/kg; el resultado B (toxicidad manifiesta y/o < 1 muerte) o C (no toxicidad) determinará que la sustancia se considere no clasificada con arreglo al SAM. De la misma manera, si se utiliza una dosis inicial distinta de 5 000 mg/kg se pasará a la de 5 000 mg/kg en caso de que se dé un resultado C a 2 000 mg/kg; un posterior resultado A a 5 000 mg/kg dará lugar a que la sustancia se clasifique en la categoría 5 del SAM y los resultados B y C a que se considere no clasificada.

ANEXO 4

MÉTODO DE PRUEBA B.1 bis

Orientaciones sobre clasificación según el plan comunitario para el período de transición hasta la plena aplicación del Sistema Armonizado Mundial (SAM) [tomado de (8)]




Dosis inicial: 300 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg*
A B C
Clasificación UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dosis Inicial: 2 000 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg
A B C
Clasificación UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Resultado
A ≥ 2 muertes
B ≥ 1 con toxicidad manifiesta y/o 1 muerte
C No hay toxicidad manifiesta ni muerte
T+ = muy tóxica
T = tóxica
H = nociva
U = no clasificada
Tamaño del grupo
Entre los 5 animales de cada grupo del estudio principal se incluirá cualquier animal tratado a ese nivel de dosis en el estudio preliminar
* Interrupción por razones de bienestar animal
Si este nivel de dosis provoca la muerte en el estudio preliminar, no se tratarán más animales y se pasará directamente al resultado A

▼B

B.1 *ter* TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUCCIÓN

El método de las clases de toxicidad aguda (1) establecido en este ensayo es un procedimiento por fases en el que se utilizan 3 animales de un mismo sexo en cada fase. Según la mortalidad y/o la aparición de síntomas de agonía en los animales, pueden requerirse 2-4 fases para juzgar sobre la toxicidad aguda de la sustancia estudiada. Este procedimiento es reproducible, utiliza muy pocos animales y permite clasificar sustancias de manera semejante a los demás métodos de ensayo de toxicidad aguda. El método de las clases de toxicidad aguda se basa en evaluaciones biométricas (2) (3) (4) (5) con dosis fijas, separadas adecuadamente de manera que permitan ordenar una sustancia con fines de clasificación y evaluación de riesgos. Este método en su versión de 1996 fue validado ampliamente *in vivo* con respecto a datos DL_{50} tomados de la bibliografía, tanto a nivel nacional (6) como internacional (7).

En el Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8) se dan directrices sobre la selección del método de ensayo más adecuado en función del objetivo. Además, en este documento orientativo se facilita información complementaria sobre la realización e interpretación del método de ensayo B.1 *ter*.

No es necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados por sus efectos corrosivos o muy irritantes. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo serán sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En otro documento orientativo (9) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

El método utiliza dosis previamente definidas y los resultados permiten ordenar y clasificar las sustancias de acuerdo con el Sistema Armonizado Mundial (SAM) [Globally Harmonised System (GHS)] de clasificación de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (10).

En principio, con este método no se pretende calcular una DL_{50} precisa, sino determinar unas gamas de exposición definidas en las que puede esperarse la aparición de letalidad, ya que la muerte de una parte de los animales sigue siendo su parámetro principal. El método permite la determinación del valor DL_{50} solo cuando al menos dos dosis producen una mortalidad superior al 0 % e inferior al 100 %. La utilización de dosis previamente definidas, independientemente de la sustancia que se ensaye, y la relación explícita entre la clasificación y el número de animales observados en diferentes estados, mejora la concordancia entre la información facilitada por distintos laboratorios, así como la repetibilidad.

▼B

El laboratorio que haga los ensayos debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia estudiada antes de llevar a cabo el estudio. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo,* los datos toxicológicos sobre otras sustancias estructuralmente relacionadas, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los afectados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana y ayuda a la selección de la dosis inicial más adecuada.

1.2 DEFINICIONES

Toxicidad oral aguda: efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas dentro de un período de 24 horas.

Muerte retardada significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el período de observación de 14 días.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. La dosis se expresa en peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal sometido al experimento (por ejemplo, mg/kg).

SAM: Sistema Armonizado Mundial [Globally Harmonised System (GHS)] de clasificación y etiquetado de productos químicos. Actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), el Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas (propiedades físico-químicas) y la OIT (comunicación de riesgos), coordinada por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de Sustancias Químicas (IOMC, en sus siglas inglesas).

Muerte inminente: fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación previsto. Entre los signos que indican esta situación en los roedores cabe citar: convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. [Para más información véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (9)].

DL_{50} (dosis letal mediana): dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. El valor de la DL_{50} se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (mg/kg).

Dosis límite: dosis del límite máximo del ensayo (2 000 o 5 000 mg/kg).

Agonía: situación en la que el animal se está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento. [Para más información véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (9)].

Muerte previsible: presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua. [Para más información, véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (9)].

▼B

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio en el que se inspira el ensayo, basado en un procedimiento por fases en cada una de las cuales se utiliza un número mínimo de animales, es obtener información sobre la toxicidad aguda de la sustancia estudiada que sea suficiente para permitir su clasificación. La sustancia se administra por vía oral a un grupo de animales de experimentación a una de las dosis definidas. En el ensayo se sigue un procedimiento por fases, utilizándose en cada fase tres animales del mismo sexo (normalmente hembras). Según la ausencia o presencia de mortalidad debida a la sustancia en los animales tratados en una fase determinada se decide cuál será la fase siguiente, es decir:

— terminación del ensayo (no se requieren más ensayos),

— administración de la misma dosis de la sustancia a otros tres animales,

— administración de la dosis inmediatamente superior o inferior a otros tres animales.

En el anexo 1 se dan detalles del procedimiento del ensayo. El método permitirá emitir un juicio respecto a la clasificación de la sustancia en una clase de toxicidad dentro de una serie de clases definidas mediante valores límite de DL_{50}.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 **Selección de la especie animal**

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se emplean hembras (9). Se hace así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de DL_{50} muestra que normalmente hay poca diferencia en cuanto a sensibilidad entre los sexos, pero, en los casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles (11). Sin embargo, si se conocen propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que es probable que los machos sean más sensibles, deberá utilizarse este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente.

Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El animal, al inicio de la administración de la sustancia, debe tener entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo del ± 20 % del peso medio de los animales a los que previamente se haya administrado la sustancia.

1.4.2 **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ºC (± 3 ºC). Aunque la humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede darse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

▼B

1.4.3 **Preparación de los animales**

Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar la administración de la sustancia, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

1.4.4 **Preparación de las dosis**

En general, las sustancias estudiadas deben administrarse en un volumen constante para toda la gama de dosis que deban ensayarse, variando la concentración del preparado administrado. Sin embargo, cuando deba administrarse una mezcla o producto final líquidos, puede resultar más adecuado para la posterior evaluación de riesgos utilizar la sustancia no diluida, es decir, a una concentración constante. Algunas autoridades reguladoras establecen este criterio con carácter obligatorio. En cualquiera de los dos casos, no debe superarse el volumen de dosis máximo. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. En los roedores, el volumen no debe sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, de las que se pueden usar 2 ml/100 g de peso corporal. En cuanto a la formulación del preparado que se administre, se recomienda el uso de una solución/suspensión/emulsión acuosa siempre que sea posible, seguida, en orden de preferencia, por una solución/suspensión/emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca la estabilidad del preparado durante el período en que se vaya a utilizar y conste que esta es aceptable.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 **Administración de las dosis**

La sustancia estudiada se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o cánula adecuada de intubación. Cuando se dé el caso, poco habitual, de que no pueda administrarse una dosis única, se podrá dividir esta en pequeñas partes durante un período que no sobrepase las 24 horas.

Los animales se mantendrán en ayunas antes de la administración de la dosis (por ejemplo, las ratas no deberán recibir alimento alguno durante la noche, pero sí agua; los ratones no deberán recibir alimento durante 3-4 horas, pero sí agua). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada esta, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 o 4 horas en el caso de las ratas y 1 o 2 horas cuando se trate de ratones. Si se administra la dosis en pequeñas partes a lo largo de un cierto período podrá ser necesario dar comida y bebida a los animales, en función de la duración de dicho período.

1.5.2 **Número de animales y dosis**

Se utilizarán tres animales en cada fase. La dosis inicial se seleccionará entre las cuatro dosis fijas, es decir, 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg de peso corporal. La dosis inicial será la que produzca con mayor probabilidad la muerte de algunos de los animales a los que se administre. En los diagramas del anexo 1 se describe el procedimiento que debe seguirse para cada una de las dosis iniciales. Además, el anexo 4 da orientaciones sobre la clasificación en el sistema comunitario hasta que se aplique el nuevo SAM.

▼B

Cuando la información indique que no es probable la aparición de mortalidad con la dosis inicial máxima (2 000 mg/kg peso corporal), se realizará una prueba límite. Si no hay información sobre una sustancia estudiada, por razones de bienestar animal, se recomienda utilizar como dosis inicial 300 mg/kg peso corporal.

El intervalo de tiempo entre los grupos de tratamiento se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de animales con la dosis siguiente no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados.

Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otro nivel de dosis superior de 5 000 mg/kg (véase el anexo 2). Por razones de bienestar animal, se desaconseja el ensayo en animales de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (2 000-5 000 mg/kg). Este ensayo solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal o del medio ambiente.

1.5.3 **Ensayo límite**

El ensayo límite se utiliza en situaciones en las que el experimentador tiene información de que la sustancia estudiada es probable que no sea tóxica, es decir, solo resulta tóxica por encima de las dosis límite reglamentarias. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos, mezclas o productos ensayados semejantes, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en la que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 2 000 mg/kg peso corporal con seis animales (tres por fase). Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 5 000 mg/kg peso corporal con tres animales (véase el anexo 2). Si aparece mortalidad debida a la sustancia, puede ser necesario realizar una prueba complementaria al nivel inmediatamente inferior.

1.6 OBSERVACIONES

Tras la administración de la dosis, se observan los animales uno por uno, al menos una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención durante las primeras 4 horas, y a continuación diariamente, a lo largo de un total de 14 días, excepto cuando tengan que eliminarse del estudio y sacrificarse de manera compasiva por razones de bienestar animal o bien cuando resulten muertos. Sin embargo, no se debería fijar rígidamente la duración de la observación sino que esta debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos (12). Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

▼B

Será necesario hacer más observaciones si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad locomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso y signos continuos de sufrimiento intenso deberán sacrificarse de forma compasiva. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

1.6.1 **Peso corporal**

Cada animal se pesará justo antes de la administración de la sustancia, y después al menos una vez por semana. Se calcularán y registrarán los cambios de peso. Al final de la prueba, los animales supervivientes se pesarán antes de sacrificarse de forma compasiva.

1.6.2 **Patología**

Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por Tazones de bienestar animal, se someterán a necropsia macroscópica. Se registrarán los cambios patológicos macroscópicos de cada animal. Podrá considerarse también la realización del examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica, en los animales que sobrevivan un mínimo de 24 horas, ya que este examen puede proporcionar información útil.

2. **RESULTADOS**

Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, se reunirán todos los resultados en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la necropsia.

3. **INFORME**

3.1 **Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Sustancia estudiada:

— naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización),

— identificación química, incluido el número CAS.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua. Animales sometidos a ensayo:

especie y cepa utilizadas,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

▼B

— número, edad y sexo de los animales (incluida, cuando proceda, una justificación del uso de machos en vez de hembras),

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones de ensayo:

— información sobre la formulación de la sustancia de ensayo, incluida la forma física del material administrado,

— datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración,

— datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluido el origen/tipo de la dieta y el origen del agua),

— justificación de la elección de la dosis inicial.

Resultados:

— tabulación de las respuestas y los niveles de dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad naturaleza, gravedad y duración de los efectos),

— tabulación del peso corporal y los cambios en el mismo,

— peso de cada animal el día en que se administre la dosis, posteriormente a intervalos semanales, y en el

— momento de la muerte o el sacrificio,

— fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio previsto,

— cronología de la aparición de signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal,

— resultados de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method-An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute- Toxic-Cíass Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental. Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

ANEXO 1

PROCEDIMIENTO QUE DEBE SEGUIRSE PARA CADA UNA DE LAS DOSIS INICIALES

OBSERVACIONES GENERALES

Para cada dosis inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

— Anexo 1 a: la dosis inicial es 5 mg/kg de peso corporal.

— Anexo 1 b: la dosis inicial es 50 mg/kg de peso corporal.

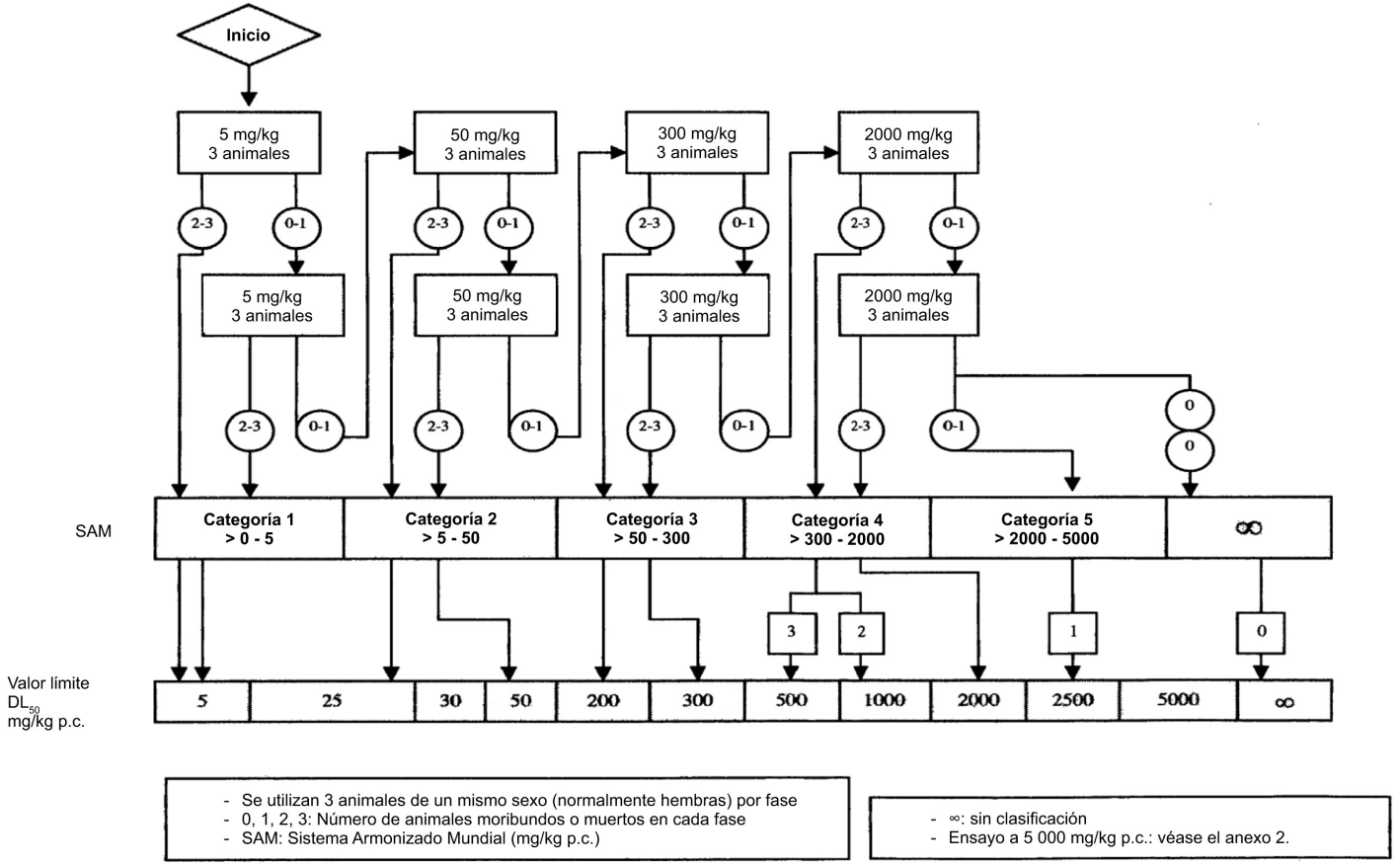
— Anexo 1 c: la dosis inicial es 300 mg/kg de peso corporal.

— Anexo 1 d: la dosis inicial es 2 000 mg/kg de peso corporal.

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

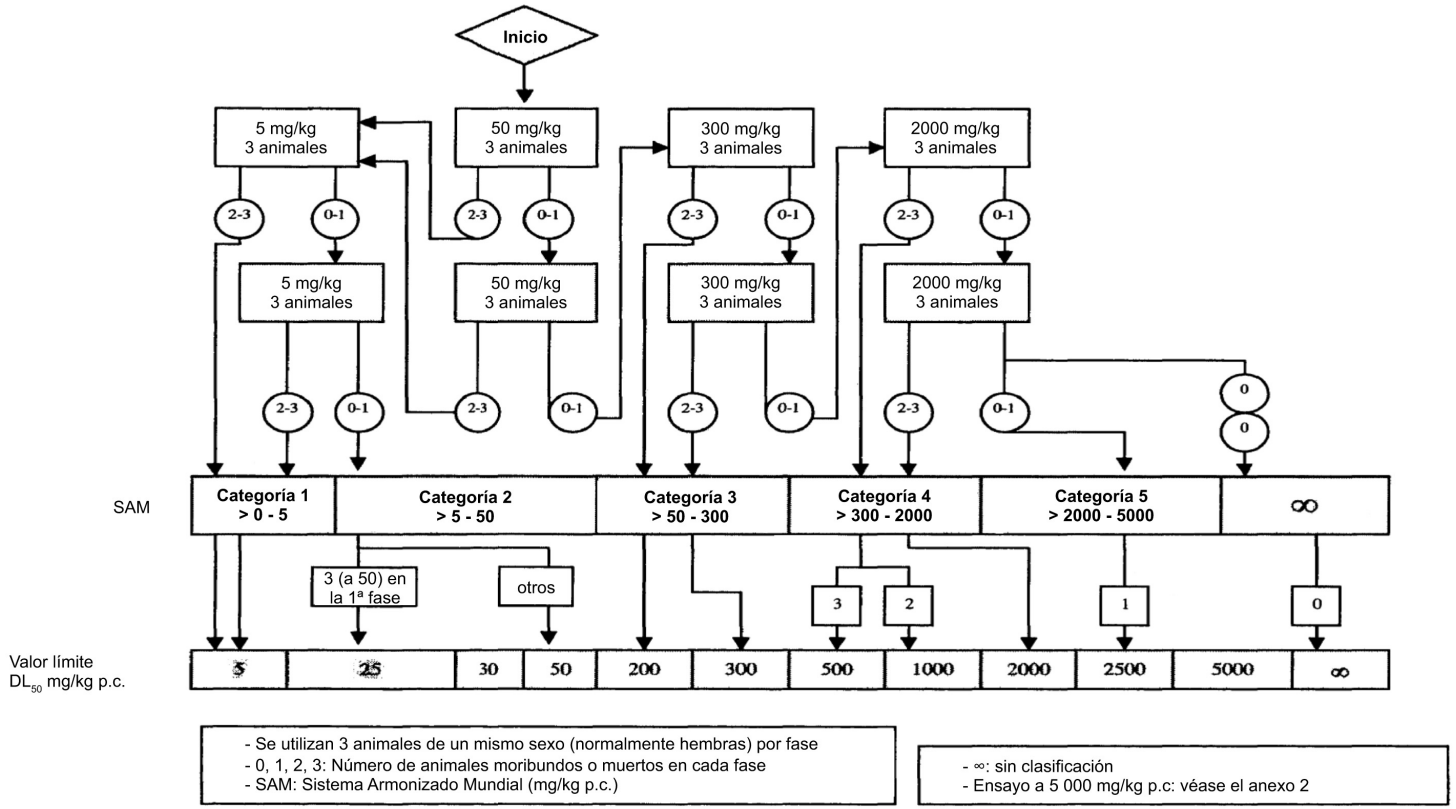
Anexo 1 A

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 5 MG/KG DE PESO CORPORAL



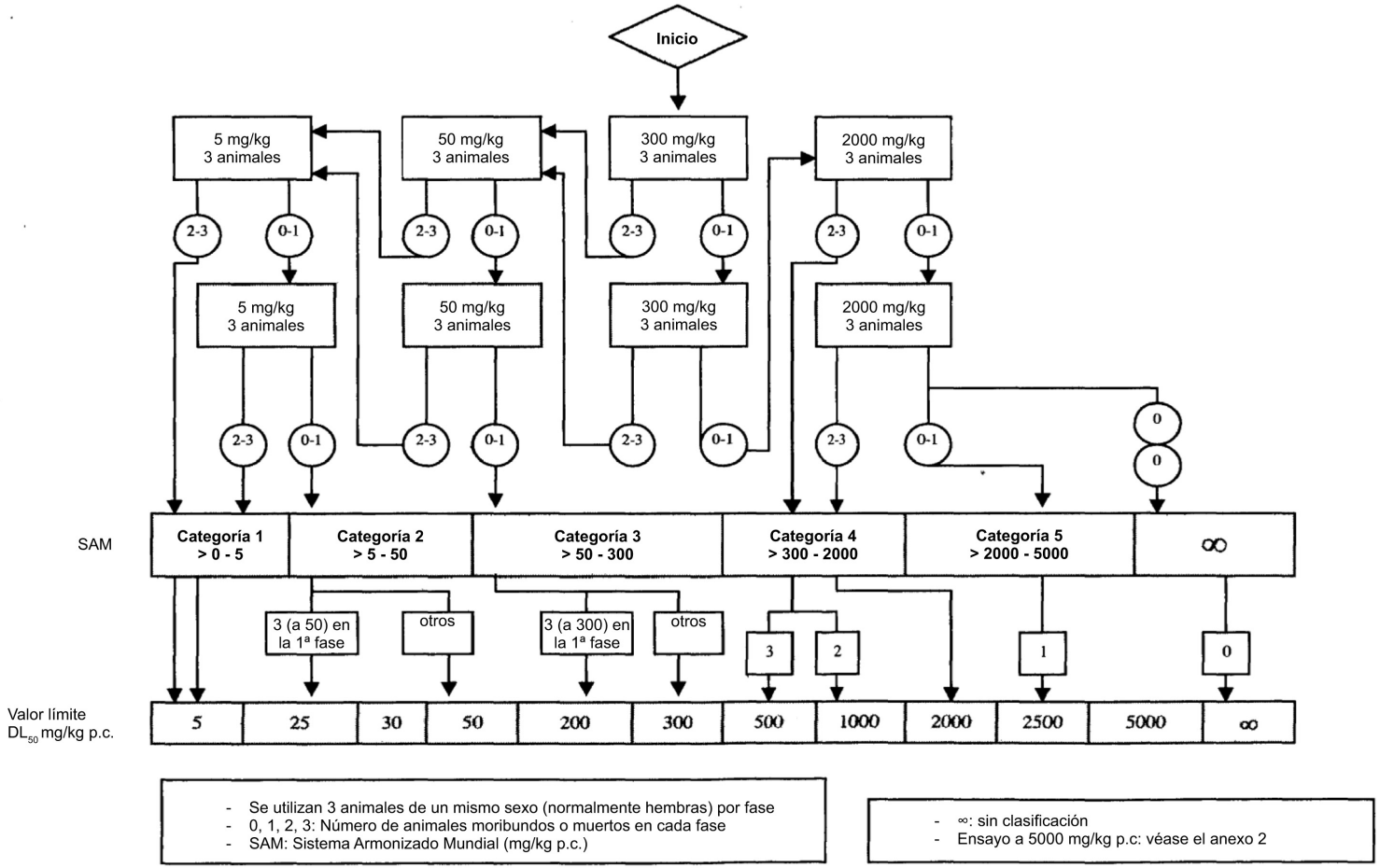
ANEXO 1B

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 50 MG/KG DE PESO CORPORAL



ANEXO 1C

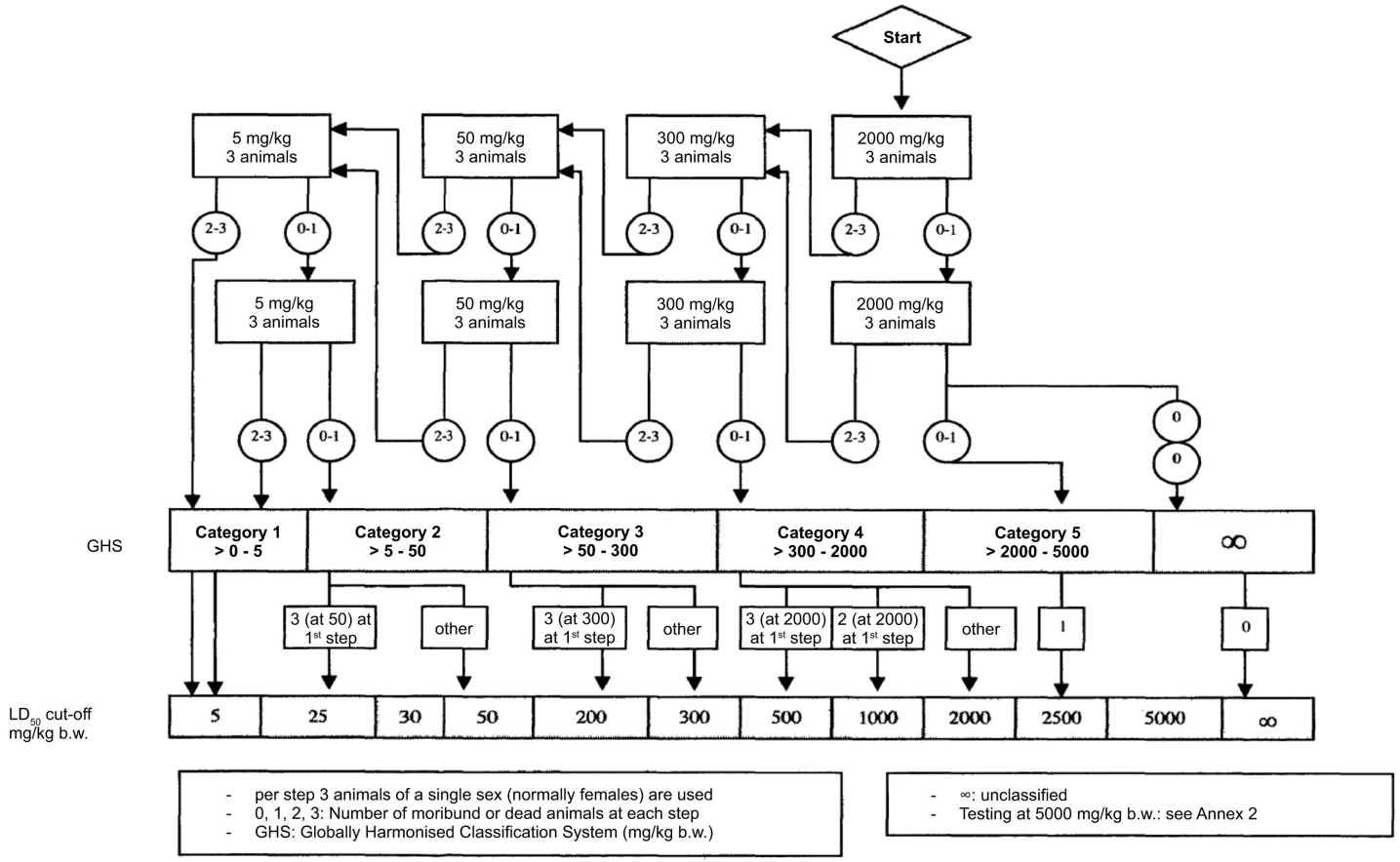
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 300 MG/KG DE PESO CORPORAL



▼B

ANEXO 1 D

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 2 000 MG/KG DE PESO CORPORAL



▼B

ANEXO 2

CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS CON VALORES DL_{50} PREVISTOS SUPERIORES A LOS 2 000 MG/KG SIN NECESIDAD DE ENSAYO

Los criterios de la categoría de peligro 5 tienen por objeto permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que, en determinadas circunstancias, puedan representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una DL_{50} oral o dérmica dentro del intervalo 2 000-5 000 mg/kg o dosis equivalentes por otras vías. Las sustancias estudiadas deben clasificarse en la categoría de peligro definida por 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (categoría 5 del SAM), en los siguientes casos:

a) cuando cualquiera de los esquemas de ensayo del anexo 1a-1d lleve a esta categoría, basándose en las cifras de mortalidad;

b) cuando se disponga ya de datos fiables que indiquen que la DL_{50} se sitúa dentro del intervalo de los valores de la categoría 5; o cuando otros estudios en animales o los efectos tóxicos observados en las personas susciten inquietud grave acerca de la salud humana;

c) mediante extrapolación, estimación o medición de datos si no está justificada la clasificación en una categoría más peligrosa, y

   — se dispone de información fiable que indique la existencia de efectos tóxicos significativos en los seres humanos, o

   — se observe mortalidad cuando se efectúen ensayos hasta la categoría 4 por vía oral, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen que se dan signos clínicos significativos de toxicidad al efectuar ensayos hasta los valores de la categoría 4, excepto en el caso de diarrea, piloerección o aspecto alterado, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen información fiable obtenida a partir de otros estudios en animales que indique un potencial de efectos agudos significativos.

ENSAYOS A DOSIS SUPERIORES A 2 000 MG/KG

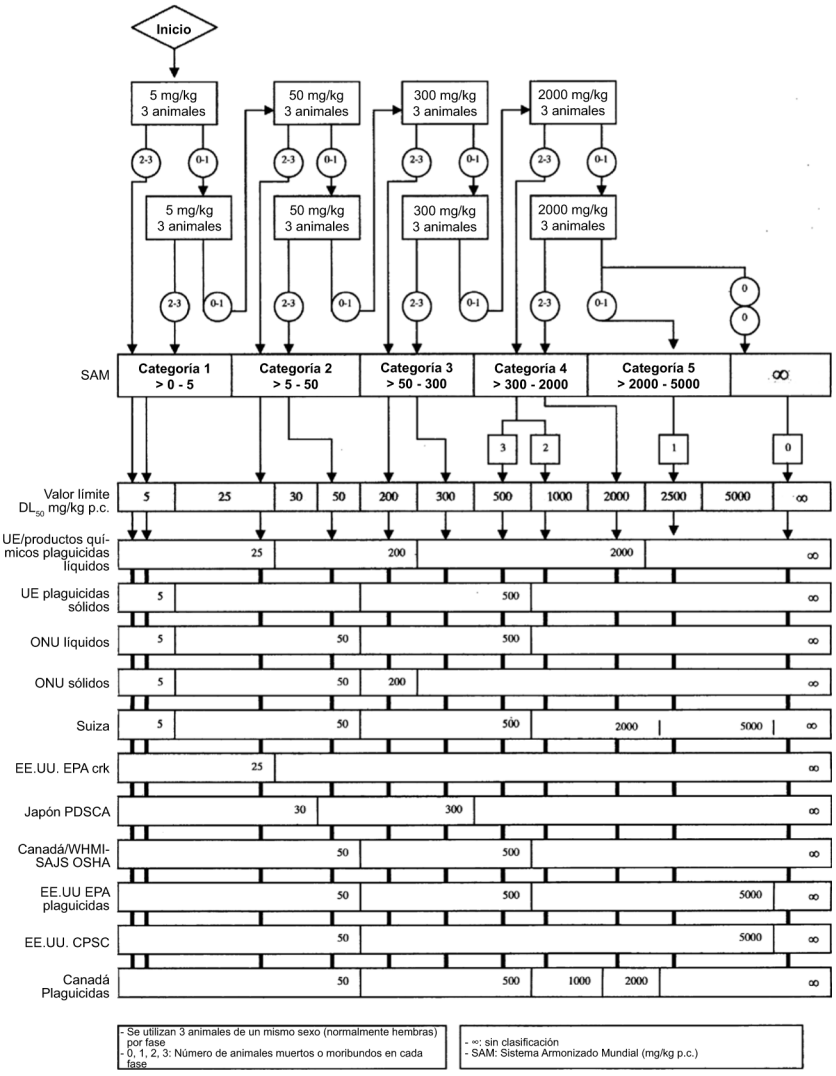
Reconociendo la necesidad de proteger el bienestar animal, se desaconseja el ensayo de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (2 000-5 000 mg/kg) con animales. Este solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal (10). No deben hacerse otros ensayos a dosis superiores.

Cuando tenga que hacerse un ensayo a 5 000 mg/kg, solo se requiere una fase (es decir, tres animales). Si el primer animal al que se administre la dosis muere, se pasará a la dosis de 2 000 mg/kg de acuerdo con los diagramas del anexo 1. Si el primer animal sobrevive, se tratará a dos animales más. Si muere solo uno de los tres animales, se prevé que la DL_{50} supere los 5 000 mg/kg. Si ambos animales mueren, se pasará a la dosis de 2 000 mg/kg.

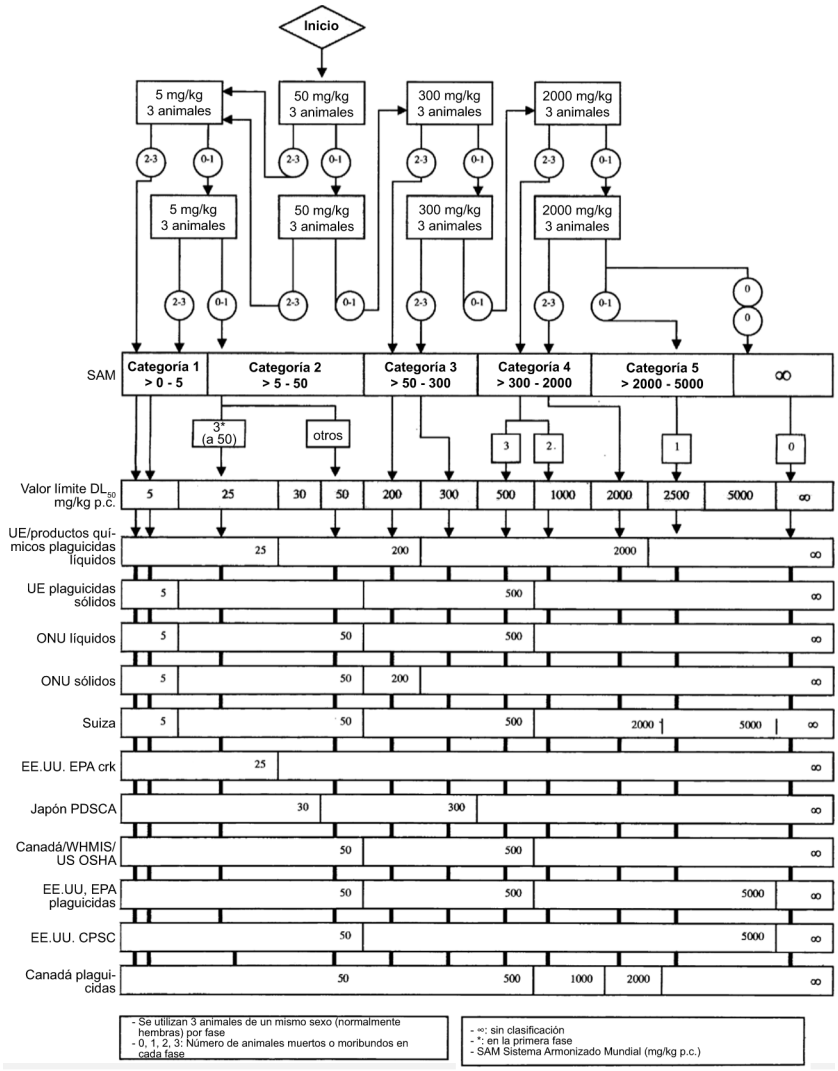
▼B

ANEXO 3

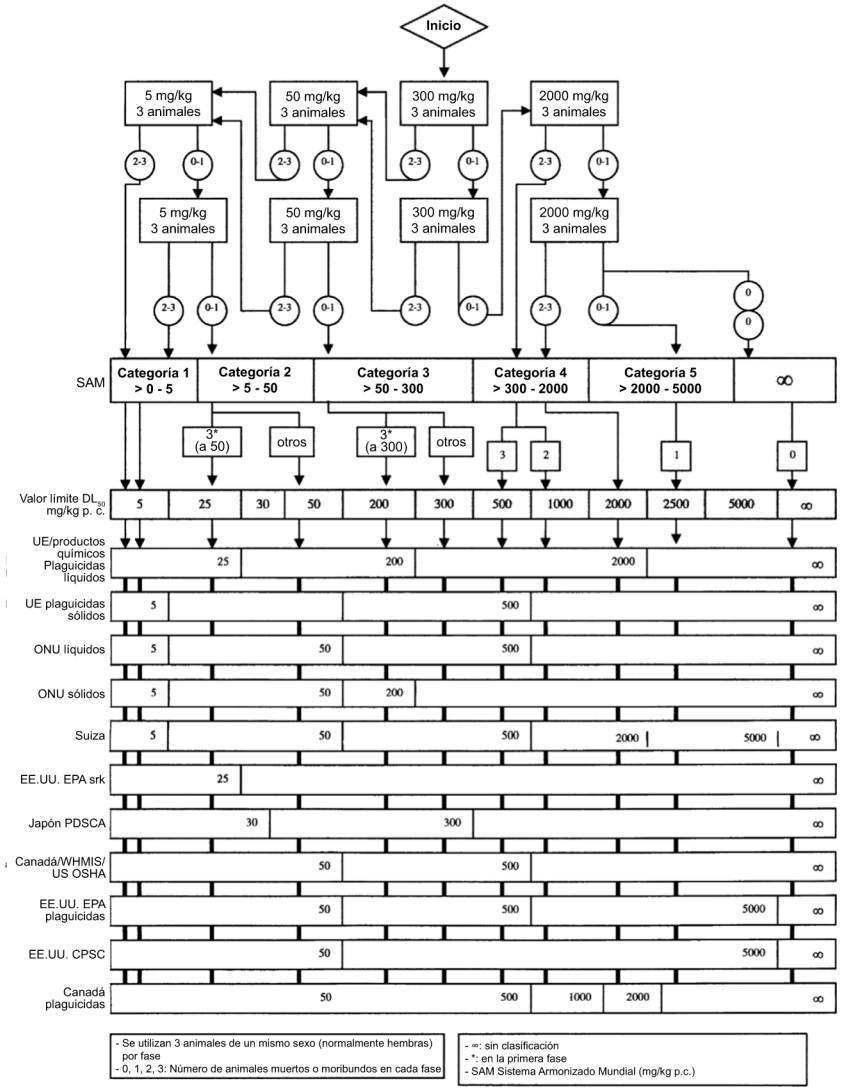
Método de prueba B.1 *ter*: Orientaciones sobre clasificación según el plan comunitario para el período de transición hasta la plena aplicación del Sistema Armonizado Mundial (SAM) [tomado de (8)]



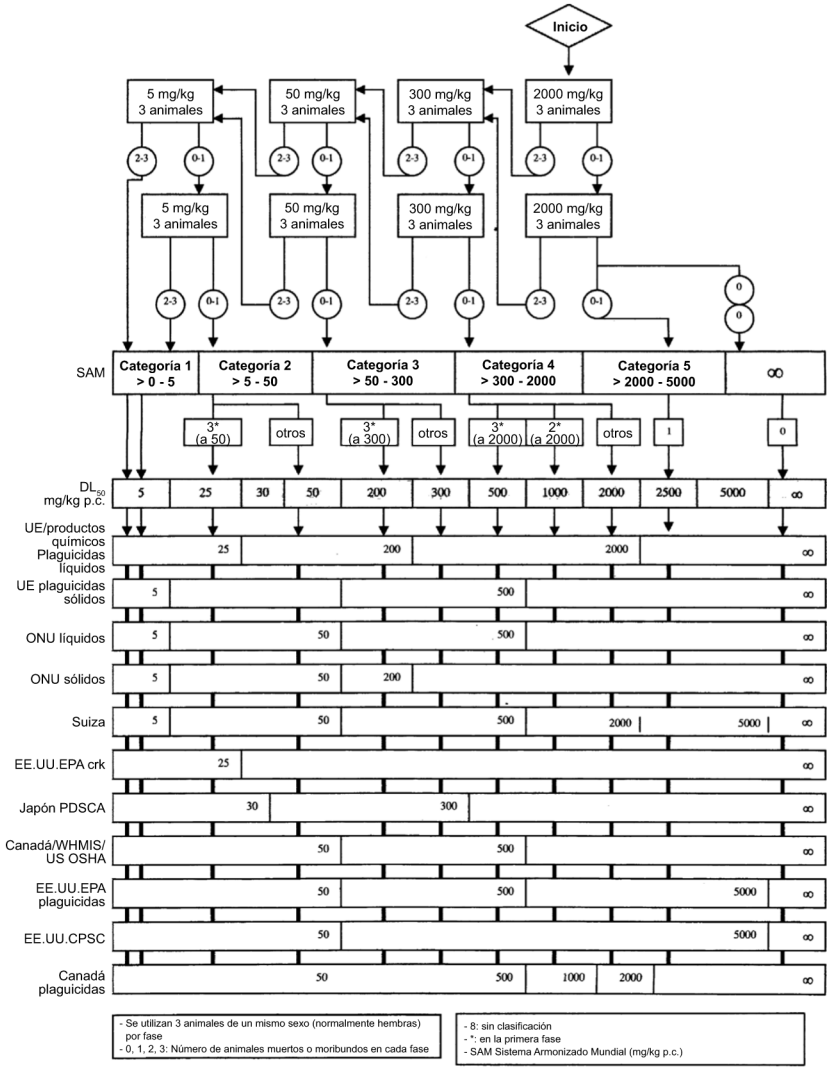
▼B


Inicio
5 mg/kg 3 animales
50 mg/kg 3 animales
300 mg/kg 3 animales
2000 mg/kg 3 animales
2-3
0-1
0
SAM
Categoría 1 > 0 - 5
Categoría 2 > 5 - 50
Categoría 3 > 50 - 300
Categoría 4 > 300 - 2000
Categoría 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
otros
Valor límite DL50 mg/kg p.c.
UE/productos químicos plaguicidas líquidos
UE plaguicidas sólidos
ONU líquidos
ONU sólidos
Suiza
EE.UU. EPA crk
Japón PDSCA
Canadá/WHMIS/ US OSHA
EE.UU, EPA plaguicidas
EE.UU. CPSC
Canadá plaguicidas
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
- 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase
- ∞: sin clasificación
- *: en la primera fase
- SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Inicio
5 mg/kg 3 animales
50 mg/kg 3 animales
300 mg/kg 3 animales
2000 mg/kg 3 animales
2-3
0-1
0
SAM
Categoría 1 > 0 - 5
Categoría 2 > 5 - 50
Categoría 3 > 50 - 300
Categoría 4 > 300 - 2000
Categoría 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
otros
3* (a 300)
otros
3
2
1
0
Valor límite DL50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/productos químicos Plaguicidas líquidos
25 200 2000 ∞
UE plaguicidas sólidos
5 500 ∞
ONU líquidos
5 50 500 ∞
ONU sólidos
5 50 200 ∞
Suiza
5 50 500 2000 5000 ∞
EE.UU. EPA srk
25 ∞
Japón PDSCA
30 300 ∞
Canadá/WHMIS/ US OSHA
50 500 ∞
EE.UU. EPA plaguicidas
50 500 5000 ∞
EE.UU. CPSC
50 5000 ∞
Canadá plaguicidas
50 500 1000 2000 ∞
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
- 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase
- ∞: sin clasificación
- *: en la primera fase
- SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Inicio
5 mg/kg 3 animales
50 mg/kg 3 animales
300 mg/kg 3 animales
2000 mg/kg 3 animales
2-3
0-1
0
SAM
Categoría 1 > 0 - 5
Categoría 2 > 5 - 50
Categoría 3 > 50 - 300
Categoría 4 > 300 - 2000
Categoría 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
otros
3* (a 300)
3* (a 2000)
2* (a 2000)
1
DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/productos químicos Plaguicidas líquidos
UE plaguicidas sólidos
ONU líquidos
ONU sólidos
Suiza
EE.UU.EPA crk
Japón PDSCA
Canadá/WHMIS/ US OSHA
EE.UU.EPA plaguicidas
EE.UU.CPSC
Canadá plaguicidas
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
- 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase
- 8: sin clasificación
- *: en la primera fase
- SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)

▼M4

B.2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 403 de la OCDE (2009) (1). Las directrices 403 (TG 403) original para ensayos de toxicidad aguda por inhalación fueron adoptadas en 1981. El presente método de ensayo B.2 (que se considera equivalente a las TG 403 revisadas) se ha diseñado para hacerlo más flexible, reducir el uso de animales y respetar la normativa legal. El método de ensayo revisado contempla dos tipos de estudios: un protocolo de CL_{50} tradicional y un protocolo de concentración × tiempo (C × t). La principal característica de este método de ensayo es su capacidad de proporcionar una relación concentración-respuesta con resultados desde no letales hasta letales que permite obtener la concentración letal mediana (CL_{50}), la concentración umbral no letal (por ejemplo, CL_{01}) y la pendiente, además de identificar una posible susceptibilidad ligada al sexo. Deberá emplearse un protocolo C × t cuando exista una necesidad científica o normativa específica que imponga la investigación con animales en diferentes períodos, como es el caso de la planificación de actuaciones de urgencia [por ejemplo, para obtener los niveles orientativos de la exposición aguda (Acute Exposure Guideline Levels, AEGL), (las directrices de planificación de la respuesta en situaciones de emergencia (Emergency Response Planning Guidelines ERPG), o los niveles umbral de exposición aguda (Acute Exposure Threshold Levels, AETL)] o de la planificación del uso del suelo.

2. Se encontrará una guía para la realización e interpretación de estudios según este método de ensayo en el "Documento de orientación sobre los ensayos de toxicidad por inhalación aguda" [*Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39)] (2).

3. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en GD 39 (2).

4. Este método de ensayo permite hacer una caracterización de la sustancia química problema y una evaluación cuantitativa del riesgo, además de ordenar y clasificar los compuestos químicos con arreglo al Reglamento (CE) nº 1272/2008 (3). El GD 39 (2) proporciona una orientación para seleccionar el método de ensayo adecuado a los estudios de toxicidad aguda. Cuando solamente se necesite información sobre la clasificación y el etiquetado, se recomienda de manera general consultar el capítulo B.52 de este anexo (4) [véase el GD 39 (2)]. El presente método de ensayo B.2 no ha sido concebido específicamente para el análisis de productos especializados, como materiales fibrosos o isométricos escasamente solubles o nanomateriales manufacturados.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. Antes de considerar la aplicación de este método de ensayo y con el fin de minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de análisis deberá tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia problema, sin olvidar los estudios existentes [consúltese, por ejemplo, el capítulo B.52 de este anexo (4)] cuyos datos pudieran desaconsejar la realización de nuevas investigaciones. En la selección de especie, variedad, sexo, modo de exposición y concentraciones analíticas adecuadas serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo,* los usos y la posible exposición humana previstos, los cálculos (Q)SAR y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias estructuralmente afines [véase el GD 39 (2)].

▼M4

6. En la medida de lo posible, deberá evitarse la investigación de sustancias irritantes o corrosivas que previsiblemente vayan a provocar dolor o daños intensos. Con objeto de esclarecer si es posible prescindir de nuevas investigaciones, el potencial corrosivo/irritante deberá ser evaluado por expertos sobre la base de la experiencia en hombres y animales (por ejemplo, estudios de administración continuada realizados con concentraciones no corrosivas/irritantes), los datos *in vitro* existentes [consúltense los capítulos B.40 (5) y B.40 *bis* (6) del presente anexo o las TG 435 de la OCDE (7)], los valores de pH, la información acerca de sustancias afines o cualquier otro dato pertinente. En caso de necesidades normativas específicas (por ejemplo, a los fines de planificar actuaciones de urgencia), se podrá aplicar el presente método de ensayo para exponer animales a los productos mencionados, por cuanto permite al investigador principal o al director del estudio un control sobre la selección de las concentraciones de exposición. Ahora bien, las concentraciones previstas no deberán provocar efectos de irritación/corrosión graves, pero sí suficientes para ampliar la curva de concentración-respuesta a un intervalo que cubra el objetivo normativo y científico del ensayo. Estas concentraciones se seleccionarán según cada caso y se justificará debidamente la selección [véase el GD 39 (2)].

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Este método de ensayo B.2 revisado se ha concebido para obtener una información acerca de la toxicidad aguda de la sustancia problema suficiente para permitir su clasificación, así como los datos de letalidad (por ejemplo, CL_{50}, CL_{01} y pendiente) de uno o ambos sexos que se precisen para la evaluación cuantitativa del riesgo. El presente método de ensayo consta de dos métodos. El primer método es un protocolo tradicional en el que varios grupos de animales se exponen a una concentración límite (ensayo límite) o a una serie de concentraciones progresivas durante un período predeterminado que suele ser de 4 horas. Pueden aplicarse otros tiempos de exposición con fines normativos específicos. El segundo método es un protocolo de C × t en el que los grupos de animales se exponen a una sola concentración (límite) o a una serie de concentraciones durante diferentes períodos.

8. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva y en la interpretación del resultado serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (*Guidance Document on Humane Endpoints*) (8) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

9. Hay que usar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie recomendada es la rata y, en caso de usar otra especie, se justificará debidamente.

Preparación de los animales

10. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la exposición, los animales serán adultos jóvenes de 8 a 12 semanas de edad y la diferencia máxima de su peso corporal respecto del peso medio de su sexo calculado en animales previamente expuestos de la misma edad y sexo será del ± 20 %. Los animales se seleccionan al azar y se marcan para permitir su identificación individual. Se mantienen en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio. Deberán también aclimatarse al equipo del ensayo durante un breve período preliminar, para así reducir el estrés provocado por la introducción en un entorno nuevo.

▼M4

Zootecnia

11. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales de forma indebida tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

Cámaras de inhalación

12. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo por la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzan mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el GD 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

13. Las exposiciones solo por la nariz en las ratas pueden tener cualquier duración hasta un máximo de 6 horas. En los ratones, las exposiciones solo por la nariz no deben sobrepasar en principio las 4 horas. Si se requieren tiempos experimentales más prolongados deberán justificarse [véase el GD 39 (2)]. Los animales expuestos a aerosoles en cámaras de cuerpo entero se enjaularán de manera individual para evitar la ingestión de la sustancia problema debido a las conductas de limpieza de los compañeros de jaula. Se suprimirá la alimentación durante el período de exposición. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

14. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico que debe utilizarse dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará la sustancia problema durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas.

▼M4

Granulometría

15. Se controlará la granulometría de todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 4 μm, con una desviación típica geométrica (σ_g) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (2) (9) (10). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Por ejemplo, los humos metálicos pueden tener un diámetro de partícula menor, mientras que las partículas con carga, las fibras y las sustancias higroscópicas (que aumentan de tamaño en el medio húmedo de las vías respiratorias) pueden sobrepasar este límite de referencia.

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

16. Se puede recurrir a un vehículo para crear una concentración y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia problema en la atmósfera. Por regla general se dará preferencia al agua. El material particulado se puede someter a tratamientos mecánicos para obtener la granulometría deseada, pero procurando no descomponer ni alterar la sustancia problema. Cuando se considere que los procesos mecánicos pueden haber alterado la composición de la sustancia problema (por ejemplo, las temperaturas extremas de una fricción excesiva por un proceso de trituración), esta se verificará analíticamente. Se pondrá especial atención para no contaminar la sustancia problema. No es necesario analizar compuestos granulados no friables que han sido intencionadamente formulados como no inhalables. Se recurrirá a una prueba de desgaste para demostrar que no se generan partículas respirables durante la manipulación del material granulado. Si en la prueba de desgaste se generan sustancias respirables, habrá que efectuar un ensayo de toxicidad por inhalación.

Animales de control

17. No es necesario emplear un grupo de control negativo (con aire) en paralelo. Si se usa un vehículo distinto del agua para generar la atmósfera experimental, solo será necesario recurrir a un grupo de control del vehículo cuando no se disponga de datos anteriores de toxicidad por inhalación. Si un ensayo de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada; por lo tanto, no hay necesidad de controlar el vehículo.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

18. El caudal de aire de la cámara se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión de la concentración (o estabilidad) atmosférica del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de interés en la generación de una atmósfera. Se pondrá especial atención para evitar la reinspiración en las cámaras de exposición solo por la nariz en aquellos casos en los que el caudal de aire a través del sistema de exposición sea insuficiente para crear un flujo continuo del medio atmosférico problema. Se han prescrito metodologías capaces de demostrar que no tiene lugar la reinspiración en las condiciones operativas establecidas (2) (11). La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a conseguir estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases.

▼M4

Temperatura y humedad relativa de la cámara

19. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. La humedad relativa en la zona de respiración de los animales, cuando se trate de exposiciones de solo por la nariz y de cuerpo entero, se supervisará y registrará al menos tres veces en operaciones de hasta 4 horas, y cada hora en operaciones más cortas. La humedad relativa debe mantenerse idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia problema en el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

20. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en esta generación.

Sustancia problema: concentración real

21. La concentración real es la concentración de sustancia problema presente en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior caracterización analítica) o con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material en el aire es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, el aire) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trate de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases. En el informe del estudio se harán constar las concentraciones diana, nominales y reales, pero en los análisis estadísticos destinados a calcular los valores de concentración letal se emplean solo las concentraciones reales.

22. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema, y la muestra de ensayo se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa bajo el pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases u otras determinaciones. Aunque la identidad de la muestra problema no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

23. La atmósfera de exposición se mantendrá constante en la medida de lo posible y bajo supervisión continua y/o intermitente, dependiendo del método analítico. Si la técnica de muestreo es intermitente, habrá que tomar muestras de la atmósfera de la cámara por lo menos dos veces en un ensayo de cuatro horas. De no ser esto posible por darse concentraciones bajas o un caudal de aire limitado, se podrá tomar una sola muestra en todo el período de exposición. Si se producen fluctuaciones importantes de una muestra a otra, para analizar las siguientes concentraciones se tomarán cuatro muestras

▼M4

por exposición. Las concentraciones individuales de la cámara no deben desviarse de la concentración media en más de ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, y en más de ± 20 % en caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y registrará el tiempo de equilibrado de la cámara (t_{95}). La duración de cualquier exposición abarca el tiempo que tarda en generarse la sustancia problema, y tiene en cuenta el tiempo necesario para alcanzar t_{95}. En el documento de orientación GD 39 (2) se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95}.

24. Cuando se manejen mezclas muy complejas de gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos de uso final con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación, de modo que se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla y no solo de la sustancia o el componente activo (analito). En el documento de orientación GD nº 39 (2) se ofrece más información acerca de las concentraciones reales.

Sustancia problema: granulometría

25. La granulometría de los aerosoles se determinará al menos dos veces por cada período de exposición de 4 horas, empleando un impactador de cascada o un aparato alternativo como un medidor del tamaño aeorodinámico de partícula. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de impacto, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración de masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir la exposición. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases (véase el punto 15).

PROCEDIMIENTO

26. A continuación se describen dos tipos de estudios: el protocolo tradicional y el protocolo de C × t. Ambos protocolos pueden englobar un estudio preliminar, un estudio principal y/o un ensayo límite (protocolo tradicional) o de concentración límite (C × t). Cuando se sabe que uno de los sexos presenta mayor sensibilidad, el director del estudio podrá decidir que los ensayos se realicen solo en este. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Antes de comenzar el ensayo, se tomarán en consideración todos los datos disponibles para minimizar el uso de animales. Así, los datos a los que se refiere el capítulo B.52 del presente anexo (4) pueden obviar la necesidad de hacer un estudio preliminar, como también demostrar la mayor sensibilidad de uno de los sexos [véase GD 39 (2)].

▼M4

PROTOCOLO TRADICIONAL

Consideraciones generales: protocolo tradicional

27. En un estudio tradicional, se exponen lotes de animales a una sustancia problema durante un período establecido (generalmente 4 horas) en una cámara de exposición solo por la nariz o de cuerpo entero. Los animales se exponen a una concentración límite (ensayo límite) o bien a un mínimo de tres concentraciones progresivas (estudio principal). Puede realizarse un estudio preliminar antes del estudio principal, salvo que se disponga de alguna información acerca de la sustancia problema, como un estudio efectuado antes siguiendo el método del capítulo B.52 [véase GD 39 (2)].

Estudio preliminar: protocolo tradicional

28. Se recurre al estudio preliminar para calcular la potencia de la sustancia problema, identificar las diferencias de sensibilidad en función del sexo y seleccionar los niveles de exposición que se aplicarán en el estudio principal o en el ensayo límite. Para seleccionar los niveles de concentración que se aplicarán en el estudio preliminar se recurrirá a toda la información disponible, incluidos datos de (Q)SAR y los datos de sustancias afines a la estudiada. A cada concentración no se expondrán más de tres machos y tres hembras (suele ser el mínimo necesario para establecer una diferencia en función del sexo). El estudio preliminar puede versar sobre una sola concentración, pero en caso necesario se pueden analizar más concentraciones. Un estudio preliminar nunca comportará un número de animales y de concentraciones tan elevado como un estudio principal. El estudio preliminar puede sustituirse por un estudio B.52 (4) previamente realizado [véase GD 39 (2)].

Ensayo límite: protocolo tradicional

29. El ensayo límite se practica cuando se sabe o supone que la sustancia problema es prácticamente atóxica, es decir, que induce una respuesta tóxica solo cuando supera la concentración límite normativa. En un ensayo límite, un único lote compuesto por tres machos y tres hembras es expuesto a la sustancia problema a una concentración límite. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos afines teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

30. La selección de las concentraciones límite depende generalmente de los requisitos normativos. En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente (o la concentración máxima alcanzable) (3). Puede resultar técnicamente complicado generar concentraciones límite de algunas sustancias problema, especialmente de vapores y aerosoles. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (MMAD de 1-4 μm). Este se consigue a una concentración de 2 mg/l para la mayoría de las sustancias problema. El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase GD 39 (2)]. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 desaconseja los estudios que superen las concentraciones límite por razones de bienestar animal (3). El estudio de la concentración límite solo se contemplará cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana (3), lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes del ensayo límite, para confirmar que se pueden crear en la cámara las condiciones adecuadas para dicho ensayo límite.

▼M4

31. Si con la concentración límite se encuentran animales muertos o moribundos, los resultados del ensayo límite pueden servir de estudio preliminar para nuevos ensayos con otras concentraciones (véase el estudio principal). Si las propiedades físicas o químicas de una sustancia problema hacen imposible obtener una concentración límite, se estudiará la concentración máxima alcanzable. Si con la concentración máxima alcanzable la letalidad es inferior al 50 %, no son necesarios nuevos estudios. En caso de no obtener una concentración límite, el informe del estudio deberá facilitar una explicación respaldada con datos. Si la concentración máxima alcanzable de un vapor no induce toxicidad, puede ser necesario generar la sustancia problema en forma de aerosol líquido.

Estudio principal: protocolo tradicional

32. El estudio principal se realiza típicamente con cinco machos y cinco hembras (o 5 animales del sexo más sensible, si se conoce) por nivel de concentración, aplicando como mínimo tres niveles de concentración. Deben emplearse niveles de concentración suficientes para obtener un análisis estadístico sólido. El intervalo de tiempo entre los grupos de exposición se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. La exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente estudiados. Ello permitirá al director del estudio ajustar la concentración diana a la que se expondrá el siguiente lote. Dada la dependencia de tecnologías sofisticadas, esto no siempre es factible en los estudios de inhalación, por lo que la exposición de los animales al siguiente nivel de concentración deberá basarse en la opinión científica y la experiencia previas. Consúltese el documento de orientación GD 39 (2) cuando se estudien mezclas.

PROTOCOLO DE CONCENTRACIÓN × TIEMPO (C × T)

Consideraciones generales: protocolo de C × t

33. El estudio de C × t en progresión secuencial representa una alternativa al protocolo tradicional en los ensayos de toxicidad por inhalación (12) (13) (14). Con este método los animales se pueden exponer a distintas concentraciones de una sustancia problema durante períodos variables. La totalidad del estudio tiene lugar en una cámara de exposición solo por la nariz (las cámaras de cuerpo entero no resultan prácticas en este tipo de estudios). El protocolo se ilustra en un diagrama de flujo del apéndice 1. Un análisis de simulación ha demostrado que tanto el protocolo tradicional como el de C × t son capaces de rendir valores de CL_{50} sólidos, pero que el protocolo de C × t proporciona en general valores más sólidos de CL_{01} y de CL_{10} (15).

34. Un análisis de simulación ha demostrado que el uso de dos animales por intervalo de C × t (uno de cada sexo, o bien dos del sexo más sensible) es en general adecuado cuando se analizan 4 niveles de concentración y 5 tiempos de exposición en un estudio principal. En algunas circunstancias, el director del estudio puede decidir el empleo de dos ratas por sexo y por intervalo de C × t (15). El empleo de 2 animales por sexo y por valor de concentración y tiempo puede reducir el sesgo y la variabilidad de los valores estimados, aumentar el porcentaje de éxito de la estimación y mejorar el intervalo de confianza. No obstante, si el ajuste de los datos para la estimación es insuficiente (cuando se usa un animal de cada sexo o dos animales del sexo más sensible), puede bastar con agregar un quinto nivel de exposición. En GD 39 (2) se ofrecen más orientaciones sobre el número de animales y las concentraciones que deben aplicarse en un estudio de C × t.

▼M4

Estudio preliminar: protocolo de C × t

35. Se hace un estudio preliminar para estimar la potencia de la sustancia problema y seleccionar los niveles de exposición que se aplicarán en el estudio principal. Pueden tener que usarse hasta tres animales por sexo y concentración en el estudio preliminar [consúltense los detalles en el apéndice III del documento de orientación GD 39 (2)] para determinar la concentración inicial adecuada del estudio principal y reducir al mínimo el número de animales utilizados. Para establecer diferencias en función del sexo puede ser necesario emplear tres animales por sexo. Estos animales deberán someterse a una exposición única, por lo general de 240 minutos. La capacidad de generar una atmósfera experimental adecuada se establecerá en pruebas técnicas previas realizadas sin animales. Por lo regular, no será necesario realizar un estudio preliminar cuando existan datos de mortalidad obtenidos de un estudio previo según el capítulo B.52 (4). Al seleccionar la concentración diana inicial en un estudio B.2, el director del estudio tendrá en cuenta las pautas de mortalidad observadas en los estudios B.52 (4) previos, en relación con los sexos y con todas las concentraciones estudiadas [véase GD 39 (2)].

Concentración inicial: protocolo de C × t

36. La concentración inicial (sesión de exposición I) (apéndice 1) será una concentración límite o bien una concentración seleccionada por el director del estudio sobre la base de un estudio preliminar. Lotes de 1 animal/sexo se exponen a esta concentración durante diferentes períodos (por ejemplo, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos), hasta sumar un total de 10 animales (es lo que llamamos sesión de exposición I) (apéndice 1).

37. La selección de las concentraciones límite depende generalmente de los requisitos normativos. En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente (o la concentración máxima alcanzable) (3). Puede resultar técnicamente complicado generar concentraciones límite de algunas sustancias problema, especialmente de vapores y aerosoles. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (es decir, un MMAD de 1-4 μm) a una concentración límite de 2 mg/l. Esto se consigue con la mayoría de las sustancias problema. El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase GD 39 (2)]. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 desaconseja los estudios que superen la concentración límite por razones de bienestar animal (3). Los estudios que superen la concentración límite solo se contemplarán cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana (3), lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes de comenzar el estudio a la concentración inicial, para confirmar que se crean en la cámara las condiciones adecuadas a esa concentración.

38. Si con la concentración inicial se encuentran animales muertos o moribundos, los resultados obtenidos con esta concentración pueden servir como punto de partida para nuevos ensayos con otras concentraciones (véase el estudio principal). Si las propiedades físicas o químicas de una sustancia problema hacen imposible obtener una concentración límite, se estudiará la concentración máxima alcanzable. Si con la concentración máxima alcanzable la letalidad es inferior al 50 %, no son necesarios nuevos estudios. En caso de no poder obtener una concentración límite, el informe del estudio deberá facilitar una explicación respaldada con datos. Si la concentración máxima alcanzable de un vapor no induce toxicidad, puede ser necesario generar la sustancia problema en forma de aerosol líquido.

▼M4

Estudio principal: protocolo de C × t

39. La concentración inicial (sesión de exposición I) (apéndice 1) analizada en el estudio principal será una concentración límite o bien una concentración seleccionada por el director del estudio sobre la base de un estudio preliminar. Si en el transcurso o después de la sesión de exposición I se observa mortalidad, la exposición mínima (C × t) que genere mortalidad se tomará como guía para establecer la concentración y los tiempos de la sesión de exposición II. Cada sesión de exposición sucesiva dependerá de la sesión anterior (véase el apéndice 1).

40. En el caso de muchas sustancias problema, los resultados obtenidos con la concentración inicial, unidos a los de otras tres sesiones de exposición con un cuadriculado temporal más denso (es decir, el espaciado geométrico de los períodos de exposición, indicado por el factor entre los períodos sucesivos, generalmente $\sqrt{2}$), serán suficientes para establecer la relación de mortalidad C × t (15); sin embargo, puede resultar conveniente agregar un quinto nivel de exposición [véanse el apéndice 1 y el documento de orientación GD 39 (2)]. En el apéndice 1 se describe el tratamiento matemático de los resultados del protocolo C × t.

OBSERVACIONES

41. Los animales se someterán a observación clínica frecuente durante el período de exposición. Las observaciones clínicas se llevarán a cabo al menos dos veces el día de la exposición, o más frecuentemente si lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y en lo sucesivo al menos una vez al día durante un período total de 14 días. La duración del período de observación no es fija, antes bien deberá determinarse en función de la naturaleza y del tiempo de aparición de los signos clínicos y de la longitud del período de recuperación. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de tales signos de toxicidad. Todas las observaciones se anotarán sistemáticamente en los registros individuales abiertos para cada animal. Por razones de bienestar animal, los animales moribundos o que den muestras de dolor fuerte o signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva. En el momento de explorar los signos clínicos de toxicidad, se procurará que el mal aspecto inicial y los trastornos respiratorios transitorios, eventualmente derivados del procedimiento de exposición, no se confundan con signos de toxicidad química que obligarían al sacrificio prematuro de los animales. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Guidance Document on Humane Endpoints* (GD 19) (7). Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

42. Las observaciones en la jaula deberían incluir los cambios en la piel y el pelo, ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Cuando sea posible se anotarán las eventuales diferencias entre los efectos locales y los sistémicos. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento.

Pesos corporales

43. Los pesos corporales individuales se registrarán una vez durante el período de aclimatación, en el día previo a la exposición (día 0), y al menos en los días 1, 3 y 7 (y, en lo sucesivo, semanalmente) y en el momento de la muerte o de la eutanasia si se produce después del día 1. Se acepta que el peso corporal es un indicador crítico de la toxicidad, por lo que deberán vigilarse estrechamente los animales que muestren una reducción progresiva de peso $\geq$ 20 % en comparación con los valores preliminares. Los animales supervivientes se pesan y se sacrifican de forma compasiva al final del período de post-exposición.

▼M4

Anatomía patológica

44. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de descubrir la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a temperaturas suficientemente bajas para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

45. Se podrán contemplar otras exploraciones incluidas de antemano en el diseño para ampliar el valor interpretativo del estudio, como la medida del peso pulmonar de las ratas que sobrevivan o el examen microscópico de las vías respiratorias para aportar pruebas de irritación. La exploración de órganos puede extenderse a aquellos que muestren signos de anatomopatología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas y a los órganos que se saben o suponen afectados. El examen microscópico de la totalidad de las vías respiratorias puede proporcionar información útil en el caso de sustancias problema que son reactivas con el agua, como las de naturaleza ácida o higroscópica.

DATOS E INFORME

Datos

46. Se documentarán por separado los datos de peso corporal y los resultados de la autopsia de cada animal. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y su reversibilidad, y los resultados de la autopsia.

Informe del ensayo

47. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Animales de experimentación y zootecnia

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

— Especie o variedad empleada y justificación para el uso de una especie distinta de la rata.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de aleatorización.

— Detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

▼M4

Sustancia problema

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación

— Descripción de la cámara de inhalación, incluidos las dimensiones y el volumen.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Equipo empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente de aire, tratamiento del aire suministrado/extraído y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del equipo para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en el sistema (de cuerpo entero).

— Homogeneidad/estabilidad temporal de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Caudales de aire, caudal del aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Descripción del equipo empleado para medir el oxígeno y el dióxido de carbono, si procede.

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que den lugar a estados físicos heterogéneos (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada uno de ellos por separado.

▼M4

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (por ejemplo, mg/l, mg/m^3, etc.); se podrán indicar además las unidades de volumen (por ejemplo, ppm, ppmm, etc.) entre paréntesis.

— Granulometría, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σ_g), incluidos los correspondientes métodos de cálculo; se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo

— Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema; cuando exista la posibilidad de que los procesos mecánicos hayan alterado la composición de la sustancia problema, se incluirán los resultados de los análisis realizados para verificar dicha composición.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficacia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados

— Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de tamaño de partícula, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, granulometría y cálculos de MMAD y σ_g.

— Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).

— Pesos corporales de cada animal registrados en el estudio; fecha y hora de la muerte si se produce antes de la eutanasia programada; cronología de la aparición de los signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal.

— Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

— Estimaciones de la letalidad (por ejemplo, CL_{50}, DL_{01}), incluidos los límites de confianza del 95 % y la pendiente (si lo permite el método de evaluación).

— Relación estadística, incluida la estimación del exponente n (protocolo de $C \times t$); se indicará el nombre del paquete informático.

▼M4

Evaluación e interpretación de los resultados

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para cumplir los criterios del presente método de ensayo, esto es, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.

— Se facilitará una explicación de si ha sido preciso sacrificar de forma compasiva animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (*Guidance Document on Humane Endpoints*) (8).

— Cuando se haya interrumpido algún estudio conforme al protocolo descrito en el capítulo B.52 del presente anexo (4) para reemplazarlo por el presente método de ensayo B.2, se harán las justificaciones pertinentes.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Reglamento CE nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

(4) Capítulo B.52 del presente anexo. Toxicidad aguda por inhalación. Método de las clases de toxicidad aguda.

(5) Capítulo B.40 del presente anexo. Corrosión cutánea in vitro: Ensayo de Resistencia eléctrica transcutánea (REI).

(6) Capítulo B.40*bis* del presente anexo. Corrosión cutánea in vitro: Ensayo con modelo de piel humana.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINICIÓN

Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

Apéndice 1

Protocolo de C × t

1. El estudio de concentración × tiempo (C × t) en progresión secuencial representa una alternativa al protocolo tradicional en los ensayos de toxicidad por inhalación (12) (13) (14). Se usará preferentemente cuando exista una necesidad científica o normativa específica que imponga la investigación con animales en diferentes períodos, como es el caso de la planificación de actuaciones de urgencia o del uso del suelo. El protocolo suele comenzar con el estudio de una concentración límite (sesión de exposición I), en el que se exponen los animales a la sustancia problema durante cinco intervalos de tiempo (por ejemplo, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos), de modo que dentro de una sesión se investigan distintos tiempos de exposición (véase la figura 1). En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. Estas concentraciones solo podrán rebasarse cuando exista una necesidad científica o normativa que así lo indique (véase el punto 37 del texto principal de B.2).

2. En los casos en que exista poca o nula información sobre la toxicidad de una sustancia problema se realizará un estudio preliminar, en el que grupos de no más de 3 animales de cada sexo se expondrán a las concentraciones diana seleccionadas por el director del estudio durante 240 minutos como norma general.

3. Si se analiza una concentración límite durante la sesión de exposición I y se observa una mortalidad inferior al 50 %, no hacen falta más ensayos. Si se plantea una necesidad científica o normativa de establecer una relación concentración/tiempo/respuesta a niveles más elevados que la concentración límite indicada, la siguiente exposición se establecerá a un nivel tal que suponga dos veces la concentración límite (es decir, 2L en la figura 1).

4. Si se observa toxicidad a la concentración límite, habrá que hacer nuevos ensayos (estudio principal). Estas exposiciones adicionales tendrán lugar, bien a concentraciones más bajas (en la figura 1: sesiones de exposición II, III o IV'), bien a concentraciones más elevadas pero durante períodos más breves (en la figura 1: sesión de exposición IV), acortando los tiempos de exposición y los intervalos entre ellos.

5. El ensayo (de la concentración inicial y las adicionales) se lleva a cabo empleando 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo, o bien 2 animales del sexo más sensible por valor de concentración/tiempo. En algunas circunstancias, el director del estudio puede decidir el uso de 2 ratas por sexo y por valor de concentración/tiempo (o 4 animales del sexo más sensible por valor de concentración/tiempo) (15). El empleo de 2 animales por sexo y por valor de concentración/tiempo puede reducir el sesgo y la variabilidad de los cálculos, mejorar el porcentaje de éxito de la estimación y aumentar el intervalo de confianza en comparación con el protocolo que se describe aquí. Se ofrece más información en el documento de orientación GD 39 (2).

6. Lo ideal es que cada sesión de exposición se efectúe en un día. Esto concede la oportunidad de retrasar la siguiente exposición hasta obtener una seguridad razonable de la supervivencia, y permite al director del estudio ajustar la concentración diana y los tiempos de la siguiente sesión de exposición. Se recomienda iniciar cada sesión de exposición con el lote que va a estar expuesto más tiempo, es decir, comenzar con el lote de 240 minutos de exposición, seguido del lote de 120 minutos, y así sucesivamente. Si, por ejemplo, los animales del lote de 240 minutos mueren ya a los 90 minutos o muestran signos graves de toxicidad (por ejemplo, alteraciones importantes de la pauta de respiración, como dificultad al respirar), carece de sentido exponer otro lote a un tiempo de 120 minutos ya que la mortalidad será probablemente del 100 %. De modo que el director del estudio seleccionará tiempos de exposición más breves para esa concentración (por ejemplo, 90, 65, 45, 33 y 25 minutos).

▼M4

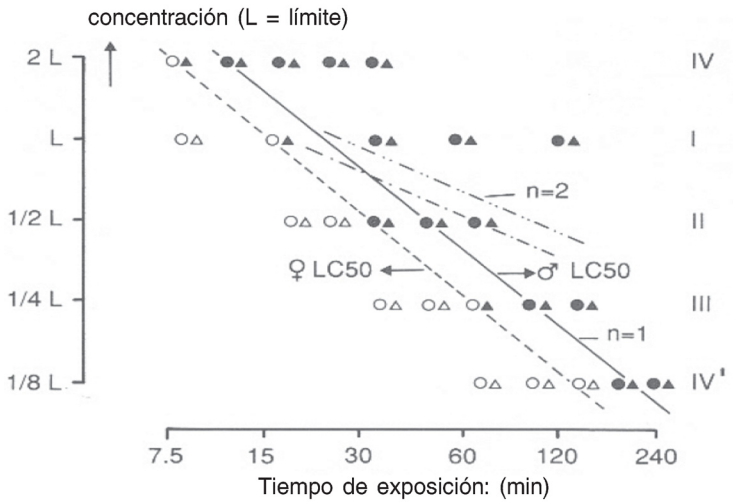
7. La concentración de la cámara se medirá con frecuencia para determinar la concentración media ponderada de cada período de exposición. Siempre que sea posible, se tomará para el análisis estadístico el momento de la muerte de cada animal (mejor que la duración de la exposición).

8. Los resultados de las cuatro primeras sesiones de exposición se analizarán con objeto de detectar lagunas en los datos de la curva de concentración-tiempo (véase la figura 1). En caso de ajuste insuficiente, se podrá proceder a una nueva exposición (5ª concentración). En ella, la concentración y los períodos de exposición se elegirán para cubrir la laguna detectada.

9. Se tomarán todas las sesiones de exposición (incluida la primera) para calcular la relación concentración-tiempo-respuesta aplicando el análisis estadístico (16). En la medida de lo posible, por cada intervalo de C × t se tomarán la concentración media ponderada en función del tiempo y la duración de la exposición hasta el momento de la muerte (si esta se produce durante la exposición).

Figura 1

Ilustración hipotética de la relación concentración-tiempo-mortalidad en la rata



Símbolos huecos = animales supervivientes; símbolos macizos = animales muertos

Triángulos = hembras; círculos = machos

Línea continua = valores de CL_{50} (intervalo de 7,5-240 min) de los machos, n = 1

Línea de trazos = valores de CL_{50} (intervalo de 7,5-240 min) de las hembras, n = 1

Líneas de puntos = valores hipotéticos de CL_{50} de machos y hembras, bajo el supuesto de n igual a 2 (12).

Glosario

Concentración:

Tiempo de exposición:

▼M4

10. A continuación se expone un ejemplo de progresión secuencial:

Sesión de exposición I — Estudio realizado a la concentración límite (figura 1)

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total ([a])

— Concentración diana ([b]) = concentración límite.

— Se exponen cinco lotes de animales a esta concentración diana durante períodos de 15, 30, 60, 120 y 240 minutos, respectivamente.

↓

Sesión de exposición II ([c]) — Estudio principal

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ([d]) (1/2L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

↓

Sesión de exposición III — Estudio principal

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ([d]) (1/4L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

↓

Sesión de exposición IV' — Estudio principal

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ([d]) (1/8L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

↓ o

([a]) Si no se dispone de datos de sensibilidad en función del sexo, se usarán ratas de ambos sexos, es decir, 1 animal por sexo y por concentración. De existir información previa, o si se pone de manifiesto en esta sesión de exposición que uno de los sexos es más sensible, en los siguientes ensayos se someterán 10 animales del sexo sensible (2 por cada valor de concentración/tiempo) a cada nivel de concentración.

([b]) En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. Si cabe esperar toxicidad o así lo indican los resultados del estudio preliminar, se seleccionarán concentraciones iniciales más bajas. Por necesidades científicas o normativas se podrán aplicar concentraciones más elevadas.

([c]) Idealmente, la exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente tratados. Ello permitirá al director del estudio ajustar la concentración diana y los tiempos de la siguiente sesión de exposición.

([d]) La dosis mínima (concentración × tiempo) capaz de inducir mortalidad en el estudio de la concentración inicial (primera sesión de exposición) se tomará como base para establecer la siguiente combinación de concentración y períodos de exposición. Habitualmente, la concentración se reduce a la mitad (1/2L) y los animales se exponen a un cuadriculado temporal más denso, aplicando una división geométrica de los períodos de exposición según un factor de 1,4 (√2; véase la referencia 11) en torno al tiempo que corresponde a la dosis letal mínima (tiempo × concentración) observada en la primera sesión de exposición. Según la figura 1, en la sesión de exposición I se observó mortalidad por primera vez a los 15 minutos; los tiempos aplicados durante la sesión II, por tanto, se centrarán en torno a los 30 minutos, y serán de 15, 21, 30, 42 y 60 min. Después de las dos primeras exposiciones, resulta muy aconsejable proyectar los resultados en una gráfica semejante a la indicada más arriba, y comprobar si la relación entre concentración y tiempo presenta un ángulo de 45 grados (n = 1), o si la relación concentración-tiempo-respuesta es de pendiente menos pronunciada (por ejemplo, n = 2) o más pronunciada (por ejemplo, n = 0,8). En los dos últimos casos se recomienda encarecidamente adaptar en consecuencia los siguientes valores de concentración y tiempo aplicados.

▼M4

Sesión de exposición IV — Estudio principal

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración superior ([e]) (2L) con tiempos de exposición algo más cortos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

Tratamiento matemático de los resultados obtenidos con el protocolo de C × t

11. Un estudio de C × t con 4 o 5 concentraciones y cinco períodos de exposición rendirá, respectivamente 20 o 25 puntos de datos. A partir de estos puntos de datos se puede calcular la relación C × t aplicando el análisis estadístico (16):

Ecuación1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

donde C = concentración; t = período de exposición, o

Ecuación 2:

$$Respuesta = f(C^n t)$$

donde $n = b_1/b_2$.

Aplicando la ecuación 1, se puede calcular el valor de CL_{50} para un período dado (por ejemplo, 4 horas, 1 hora, 30 minutos o cualquier período dentro del intervalo de períodos estudiados) haciendo P = 5 (50 % de respuesta). Obsérvese que la regla de Haber solo es aplicable para n = 1. La CL_{01} se puede calcular haciendo P = 2,67.

([e]) En determinados casos puede ser necesario aumentar la concentración (2L) y aplicar un cuadriculado temporal aún más denso, haciendo una división geométrica de los períodos de exposición por un factor de 1,4 (√2) en torno al tiempo que corresponde a la concentración letal mínima observada en la primera exposición. El período mínimo de exposición rebasará preferiblemente los 5 minutos; el período máximo de exposición no debe superar las 8 horas.

▼B

B.3. **TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (letra A).

1.2. DEFINICIONES

Véase la introducción general de la parte B (letra B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administran dosis diferentes de la sustancia de ensayo por aplicación cutánea a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis por lote. Se observan a continuación los efectos y la mortalidad causados por la sustancia. Se realiza la autopsia a los animales que mueran durante el ensayo así como al final de esta, a los que hayan sobrevivido.

Los animales que muestren signos de dolor y angustia graves y duraderos deberán sacrificarse de forma humanitaria. No se administrarán sustancias que produzcan dolor y angustia graves debido a sus propiedades corrosivas o irritantes.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Se mantiene a los animales en las jaulas para el experimento en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el ensayo por lo menos durante los 5 días anteriores. Antes de comenzar el ensayo se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos y se reparten entre los diferentes lotes del ensayo. Unas 24 horas antes del ensayo se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal del tronco de los animales, evitando cualquier lesión de la piel que pueda modificar su permeabilidad. La superficie que hay que preparar para la aplicación de la sustancia no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Cuando se sometan a ensayo sólidos, que puedan pulverizarse eventualmente, la sustancia deberá humedecerse con agua o, si es preciso, con un vehículo adecuado, para asegurar un buen contacto con la piel. Si se utiliza un vehículo, se habrá de tener en cuenta su incidencia sobre la penetración de la sustancia en la piel. Las sustancias líquidas, generalmente, se aplican sin diluir.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Se pueden utilizar ratas o conejos adultos. Se pueden utilizar igualmente otras especies pero, en tal caso, hay que justificar su utilización. Es preciso utilizar cepas de laboratorio corrientes. Para cada sexo, la diferencia de peso al comienzo del ensayo entre los animales utilizados no debe exceder de ± 20 % del valor medio apropiado.

▼B

1.6.2.2. *Número y sexo*

Para cada dosis se utilizarán al menos 5 animales del mismo sexo. Si se utilizan hembras, deberán ser nulíparas y no grávidas. Cuando se disponga de información que demuestre que un sexo es mucho más sensible, se utilizarán para la prueba animales de ese sexo.

Nota: Se considerará la posibilidad de utilizar un número menor de animales cuando se realicen ensayos de toxicidad aguda con animales de un orden superior al de los roedores. Las dosis se seleccionarán cuidadosamente y se hará todo lo posible por no sobrepasar dosis moderadamente tóxicas. Se evitará en esos ensayos la administración de dosis letales de la sustancia de estudio.

1.6.2.3. *Dosis*

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

1.6.2.4. *Prueba límite*

Puede realizarse un ensayo límite, con dosificación única de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal, en un grupo de 5 machos y 5 hembras, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Si hay mortalidad debida a la sustancia, habrá que considerar la realización de un estudio completo.

1.6.2.5. *Período de observación*

El período de observación debe ser de, al menos, 14 días. Sin embargo, su extensión no debe fijarse de forma rígida, sino que debe determinarse en función de las reacciones de toxicidad, su velocidad de aparición y la duración del período de curación; por lo tanto, puede prolongarse en caso de necesidad. Es importante el momento en el que aparecen y en el que desaparecen los síntomas de toxicidad, así como el momento de la muerte, sobre todo si se observa en la sustancia una tendencia a causar una muerte retardada.

1.6.3. **Procedimiento**

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. La sustancia debe aplicarse sobre una superficie equivalente al 10 % de la superficie total del cuerpo. En el caso de sustancias altamente tóxicas la superficie puede ser menor, pero procurando que en toda la superficie la sustancia forme una película lo más fina y uniforme posible.

Las sustancias de ensayo deben mantenerse en contacto con la piel por medio de un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante durante 24 horas. Además, la parte tratada debe estar convenientemente cubierta para mantener en su lugar el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Se pueden utilizar aparatos de contención para impedir que los animales ingieran la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa.

▼B

Al término del período de aplicación de la sustancia de ensayo, esta deberá eliminarse, a ser posible, con agua o con otro procedimiento adecuado de limpieza de la piel.

Las observaciones se registrarán sistemáticamente a medida que se efectúen, abriendo una ficha individual para cada animal. El primer día las observaciones deben efectuarse con frecuencia. Deberá hacerse un examen clínico atento al menos cada día laborable. Diariamente deberán hacerse otras observaciones actuando de manera que se reduzca el número de animales perdidos para el estudio, por ejemplo mediante autopsia o refrigeración de los animales muertos, así como aislamiento o sacrificio de los animales débiles o moribundos.

Las observaciones deben incluir las modificaciones del pelo, la piel tratada, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe anotarse con la mayor precisión posible. Se hará la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrare todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán te]idos para un examen histopatológico posterior.

Valoración de la toxicidad en el otro sexo

Tras completar el estudio en uno de los sexos, se hará un estudio con al menos un grupo de 5 animales del sexo contrario, de forma que quede establecido que los animales de este sexo no son mucho más sensibles a la sustancia de ensayo. En circunstancias particulares podrá justificarse el uso de menor número de animales. Cuando se disponga de información adecuada que demuestre que los animales del sexo sometido a prueba son mucho más sensibles, podrá prescindirse del ensayo en animales del otro sexo.

2. **RESULTADOS**

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote, el número de animales al principio del ensayo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. El peso de cada animal debe determinarse y anotarse poco antes de la aplicación de la sustancia y, después de la misma, una vez por semana y en el momento de su muerte; deben calcularse y registrarse las variaciones de peso cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales que se sacrifiquen de forma humanitaria debido a angustia o dolor causados por la sustancia se registrarán como muertes debidas a la sustancia. La DL_{50} debe determinarse mediante un método reconocido.

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

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

▼B

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

— condiciones de ensayo (incluido el procedimiento de limpieza de la piel y el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),

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

— sexo de los animales utilizados,

— tabla de respuestas por sexo y por dosis (número de animales que mueren o son sacrificados durante el ensayo, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte después de administrar la dosis, motivos y criterios para el sacrificio humanitario de los animales,

— todas las observaciones,

— valor de la DL_{50} para el sexo sometido a un estudio completo, determinado el decimocuarto día, indicando con precisión el método de cálculo,

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

— curva dosis/mortalidad y pendiente de la curva si el método de cálculo lo permite,

— resultados de la autopsia,

— observaciones histopatológicas,

— resultado de cualquier ensayo en el sexo contrario,

— discusión de los resultados (prestando especial atención al efecto que puede tener sobre la DL_{50} calculada el sacrificio humanitario de animales durante el ensayo),

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (letra D).

4. **REFERENCIAS**

Véase la introducción general de la parte B (letra E).

▼B

B.4. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA

1. MÉTODO

Este método de evaluación es equivalente al método TG 404 de la OCDE (2002).

1.1 INTRODUCCIÓN

En el desarrollo la confección de este método actualizado se ha prestado atención especial a las posibles mejoras en relación con las cuestiones del bienestar de los animales y con la evaluación de toda la información existente sobre la sustancia analizada, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias. En este método se incluye la recomendación de que, antes de llevar a cabo la prueba *in vivo* que se describe para evaluar la corrosión/irritación de la sustancia, hay que analizar la carga de la prueba que aportan los datos relevantes existentes. Cuando los datos disponibles sean insuficientes, se podrán obtener mediante la aplicación de secuencias de pruebas (1). La estrategia de evaluación recomendada incluye la realización de pruebas *in vitro* validadas y aceptadas, y se recoge en un anexo de este método. Además, cuando proceda, se recomienda la aplicación sucesiva, no simultánea, de tres aplicaciones de ensayo a los animales en el ensayo *in vivo* inicial.

Por interés de la ciencia y del bienestar de los animales no se realizarán pruebas *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos relevantes sobre el potencial de corrosión/irritación cutánea de la sustancia en un análisis de la carga de la prueba. Dichos datos incluirán los obtenidos en estudios existentes realizados con seres humanos o con animales de laboratorio, los demostrativos de corrosión/irritación por parte de una o más sustancias relacionadas estructuralmente o por una mezcla de las mismas, los que demuestran la elevada acidez o alcalinidad de la sustancia (2) (3) y los obtenidos en pruebas *in vitro* o *ex vivo* validadas y aceptadas (4)(5)(5a). Este análisis debe reducir la necesidad de realizar pruebas *in vivo* de la corrosión/irritación cutánea de aquellas sustancias de las que ya se disponga de datos de otros estudios efectuados sobre esos dos criterios de valoración.

En un anexo de este método se recoge el orden recomendado para efectuar los ensayos, incluidos los ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados sobre corrosión e irritación. Se trata de una estrategia desarrollada por un taller de la OCDE, cuyos participantes la recomendaron de manera unánime (6), y ha sido adoptada como estrategia de evaluación por el sistema armonizado global para la clasificación de sustancias químicas [*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances* GHS)] (7). Aunque dicha estrategia de evaluación secuencial no forma parte integrante del método de evaluación B.4, se recomienda seguirla antes de llevar a cabo ensayos *in vivo*. Es el nuevo enfoque de evaluación escalonada recomendado para obtener datos científicamente garantizados sobre la corrosión/irritación de la sustancia. Para sustancias existentes con datos insuficientes sobre su corrosión/irritación cutánea se utilizará la estrategia para obtener los datos que falten. Será necesario justificar el empleo de una estrategia o procedimiento de evaluación diferente, o la decisión de no utilizar un procedimiento escalonado.

Si no fuera posible determinar el poder de corrosión o irritación mediante un análisis de la carga de la prueba compatible con la estrategia secuencial de evaluación, se considerará la posibilidad de realizar un ensayo *in vivo* (véase el anexo).

▼B

1.2 DEFINICIONES

Irritación cutánea: lesión reversible de la piel tras la aplicación de una sustancia de ensayo durante 4 horas.

Corrosión cutánea: lesión irreversible de la piel; en concreto, necrosis visible de la epidermis y la dermis, que se produce tras la aplicación de una sustancia de ensayo durante cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, hemorragias, costras sanguinolentas y, al cabo de 14 días de observación, cambio de coloración por palidez de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Para evaluar las lesiones cuestionables se utilizará la histopatología.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

La sustancia analizada se aplica en una sola dosis a la piel de un animal de experimentación; las zonas de la piel no tratadas de dicho animal sirven de control. Se comprueba y puntúa el grado de irritación/corrosión a intervalos determinados, y luego se describen para la completa evaluación de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.

Los animales que muestren signos continuados de deterioro o dolor graves en cualquier fase del ensayo deben ser sacrificados, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Los criterios para sacrificar a los animales moribundos y que sufren intensamente se recogen en la referencia (8).

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 **Preparación para el ensayo *in vivo***

1.4.1.1 *Selección de las especies de animales*

El animal de laboratorio que se prefiere es el conejo albino; se utilizan adultos jóvenes sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

1.4.1.2 *Preparación de los animales*

Aproximadamente 24 horas antes del ensayo se afeitará el pelo con cuidado en la zona dorsal del tronco de los animales. Se tendrá cuidado en no dañar la piel, y solo se utilizarán animales con piel sana e intacta.

Algunas razas de conejo tienen densas placas de pelo que son más llamativas en determinadas épocas del año. Dichas zonas no deben utilizarse para las evaluaciones.

1.4.1.3 *Condiciones de alojamiento y alimentación*

Los animales deben ser alojados de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 ºC (± 3 ºC) para los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

▼B

1.4.2 **Procedimiento del ensayo**

1.4.2.1 *Aplicación de la sustancia estudiada*

La sustancia en estudio debe aplicarse a una pequeña zona de piel (de unos 6 cm^2), que se cubrirá con una gasa y se sujetará con esparadrapo no irritante. Cuando no sea posible la aplicación directa (por ejemplo, líquidos o algunas pastas), la sustancia en estudio se aplicará primero a la gasa, y a continuación a la piel. La gasa debe quedar en contacto suave con la piel mediante el correspondiente vendaje semioclusivo durante el período de exposición. Si se aplica la sustancia a la gasa, esta debe sujetarse a la piel de forma que el contacto sea bueno y la sustancia se distribuya de manera uniforme por la piel. Se evitará que el animal tenga acceso a la gasa y que pueda comérsela o inhalar la sustancia.

Las sustancias líquidas suelen utilizarse sin diluir para su análisis. Para evaluar sólidos (que se pueden pulverizar si se considera necesario) la sustancia se humedecerá con el mínimo de agua posible (o con otro vehículo adecuado, si se considera necesario), para garantizar un buen contacto con la piel. Si se utilizan vehículos distintos del agua, la posible influencia del vehículo sobre la irritación cutánea que produce la sustancia en estudio ha de ser mínima o ' nula.

Finalizado el período de exposición, que normalmente es de 4 horas, se eliminarán los residuos de la sustancia cuando ello sea posible, con agua o con un disolvente adecuado que no altere la respuesta producida ni la integridad de la epidermis.

1.4.2.2 *Nivel de dosis*

Se aplicará una dosis de 0,5 ml de líquido o de 0,5 de sólido o pasta en el punto de aplicación.

1.4.2.3 *Ensayo inicial (ensayo de irritación/corrosión cutánea in vivo con un animal)*

Se recomienda encarecidamente realizar el ensayo *in vivo* inicialmente con un solo animal, especialmente cuando se sospecha que la sustancia es corrosiva.

Esto coincide con la estrategia de evaluación secuencial (véase el anexo l) diando el análisis de la carga de la prueba determine que una sustancia es corrosiva no se realizarán más ensayos con animales. En la mayor parte de los casos en que se sospecha que una sustancia es corrosiva no es necesario realizar más ensayos *in vivo*. Pero cuando se crea necesario disponer de datos adicionales por no ser suficientes los obtenidos, pueden hacerse otros ensayos con animales con arreglo a los siguiente: Se hará un máximo de tres aplicaciones secuenciales al animal. La primera se retira a los tres minutos. Si no se observa reacción cutánea grave se aplica una segunda, que se retira al cabo de una hora. Si en este momento las observaciones indican que desde un punto humanitario se puede aumentar la exposición hasta cuatro horas, se hace una tercera aplicación que se retira al cabo de cuatro horas, y se gradúa la respuesta.

Si en alguna de las exposiciones secuenciales se observa un efecto corrosivo se suspende la prueba inmediatamente. Si una vez retirada la última aplicación no se observa efecto corrosivo, se somete a observación al animal durante 14 días, a menos que aparezca corrosión antes.

▼B

Si no está previsto que la sustancia analizada sea corrosiva pero sí irritante, se hará una sola aplicación a un solo animal durante cuatro horas.

1.4.2.4 *Ensayo de confirmación (ensayo de irritación cutánea in vivo con animales adicionales)*

Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más, cada uno con una aplicación, durante un período de exposición de cuatro horas. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial el ensayo de confirmación debe hacerse de forma secuencial, o exponiendo a otros dos animales a la vez. En el caso excepcional de que no se realice el ensayo inicial se podrán tratar dos o tres animales con una sola aplicación, que se retirará al cabo de cuatro horas. Cuando se utilicen dos animales no será necesario realizar más ensayos si ambos muestran la misma respuesta. En caso contrario se analizará el tercer animal. Si la respuesta es equívoca puede ser necesario evaluar a más animales.

1.4.2.5 *Período de observación*

La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la reversibilidad de los efectos observados. No obstante se dará por finalizado el experimento si en cualquier momento el animal presenta signos continuados de dolor o malestar graves. Para determinar la reversibilidad de los efectos los animales serán sometidos a observación durante 14 días a partir de la retirada de las aplicaciones. Si se observa la irreversibilidad antes de 14 días el experimento debe concluir en ese momento.

1.4.2.6 *Observaciones clínicas y graduación de las reacciones cutáneas*

En todos los animales se examinarán los signos de eritema y edema, puntuando las repuestas al cabo de 60 minutos, 24, 48 y 72 horas de la retirada de la aplicación. En el caso de ensayo inicial con un solo animal la zona de ensayo también se examina inmediatamente después de retirar la aplicación. Las reacciones cutáneas se gradúan y registran conforme a los grados de la siguiente tabla. Si al cabo de 72 horas hay una lesión que no se puede clasificar como irritación o corrosión, quizá sea necesario observarla hasta el día 14 para determinar la reversibilidad de los efectos. Además de observar la irritación se realizará una descripción completa de todos los efectos tóxicos, como la destrucción de la grasa de la piel, y de cualquier efecto adverso sistémico (por ejemplo, los efectos sobre los signos clínicos de toxicidad y el peso corporal), que se registrarán. Puede ser necesaria una evaluación histopatológica para aclarar respuestas equívocas.

La graduación de las respuestas cutáneas es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal graduación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado (véase la tabla siguiente). Puede ser útil disponer de una guía ilustrada para graduar la irritación cutánea y otras lesiones (9). La graduación de las respuestas cutáneas debe hacerse en condiciones ciegas.

2. **DATOS**

2.1 PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio se resumirán en tablas; el informe final debe cubrir todos los apartados enumerados en la sección 3.1.

▼B

2.2 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las puntuaciones de la irritación cutánea deben evaluarse junto con la naturaleza y la intensidad de las lesiones, y el hecho de si son reversibles o no. Las puntuaciones individuales no constituyen una referencia absoluta de las propiedades irritativas del material, pues también se evalúan otros efectos del material evaluado. En su lugar las puntuaciones individuales deben considerarse como valores de referencia, que han de ser evaluadas en combinación con todas las demás observaciones del estudio.

Para evaluar las respuestas irritativas hay que tener en cuenta la reversibilidad de las lesiones cutáneas. Si se producen respuestas como alopecia (zona limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación y persisten al final del período de observación de 14 días se considerará que la sustancia analizada es un irritante.

3. **NOTIFICACIÓN**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la siguiente información:

Justificación del ensayo *in vivo:* análisis de la carga de los ensayos realizados anteriormente, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial.

— descripción de datos relevantes de ensayos realizados anteriormente,

— datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación,

— descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos los resultados obtenidos con las sustancias analizadas/de referencia,

— análisis dela carga de la prueba para realizar el estudio *in vivo.*

Sustancia analizada:

— datos de identificación (por ejemplo, número CAS; origen; pureza; impurezas conocidas; número de lote),

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de los componentes.

Vehículo:

— identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado,

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— especia/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos,

— número de animales de cada sexo,

— peso de los animales individuales al principio y al final del ensayo,

— edad al inicio del estudio,

— origen de los animales, condiciones del alojamiento, dieta, etc.

▼B

Condiciones del análisis:

— técnicas de preparación de la zona donde se realizará el análisis,

— detalles de los materiales del parche utilizados, y de la técnica de aplicación del parche,

— detalles de la preparación, aplicación y retirada de la sustancia analizada.

Resultados:

— tabulación de las puntuaciones de las respuestas de irritación/corrosión de cada animal en todos los puntos temporales medidos,

— descripciones de todas las lesiones observadas,

— descripción narrativa de la naturaleza y el grado de irritación o de corrosión observado, y hallazgos histopatológicos efectuados,

— descripción de otros efectos adversos locales (por ejemplo, destrucción de la grasa de la piel) y sistémicos, además de la irritación o corrosión cutánea.

— Comentario de los resultados

4. **REFERENCIAS**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro, 2,* 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, «Skin Irritation», European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Bruselas.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483-524.

(5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pronunciado en Solna, Suecia, 22-24 de enero de 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviembre de 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, agosto de 1990.

[Puede solicitarse a la Secretaría de la OCDE].

▼B

Tabla I

GRADUACIÓN DE LAS REACCIONES CUTÁNEAS

Eritema y formación de escaras

Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (enrojecimiento color carne) o formación de escaras que impide graduarlo	4

Máximo posible 4

Formación de edema

Sin edema	0
Edema muy leve (apenas perceptible)	1
Edema ligero (los bordes de la zona están bien definidos por elevaciones concretas)	2
Edema moderado (elevación de 1 mm aproximadamente)	3
Edema intenso (elevación superior a 1 mm y extensión que sobrepasa la zona de exposición)	4

Máximo posible: 4

Puede ser necesaria una evaluación histopatológica para aclarar respuestas equívocas.

▼B

ANEXO

Estrategia de evaluación secuencial de la irritación y la corrosión cutáneas

CONSIDERACIONES GENERALES

Aunque la presente estrategia de evaluación secuencial no forma parte integrante del método de evaluación B.4., sí expresa el enfoque recomendado para la determinación de las características de irritación/corrosión cutáneas. Este enfoque representa la práctica óptima y una piedra angular desde el punto de vista ético para el análisis *in vivo* de la irritación/corrosión cutáneas. El método de evaluación proporciona instrucciones para la realización del ensayo *in vivo,* y resume los factores que se han de abordar antes de ponerla en marcha. La estrategia proporciona un enfoque para la evaluación de los datos existentes sobre las propiedades de irritación/corrosión cutáneas de las sustancias analizadas, y un enfoque por partes para generar datos relevantes sobre sustancias que necesitan estudios adicionales o que no han sido estudiadas. También recomienda la realización de ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados para la corrosión/irritación cutáneas en circunstancias concretas.

Es importante evitar el uso innecesario de animales y reducir al mínimo los ensayos que con toda probabilidad producen respuestas graves en los animales, por su bienestar y por motivos científicos. Antes de considerar la realización de ensayos *in vivo* hay que evaluar toda la información sobre una sustancia en lo que respecta a su posible poder corrosivo/irritativo cutáneo. Puede que existan pruebas suficientes para clasificar el potencial corrosivo o irritativo dérmico de una sustancia analizada, sin necesidad de realizar ensayos con animales de laboratorio. Por eso el uso del análisis de la carga de la prueba y de una estrategia de evaluación secuencial reducirá al mínimo la necesidad de realizar ensayos *in vivo,* especialmente si es probable que la sustancia produzca reacciones graves.

Se recomienda utilizar un análisis de la carga de la prueba para evaluar la información existente sobre el potencial de irritación y corrosión cutáneas producidas por las sustancias, que permitirá determinar si la realización de estudios adicionales, a parte de los cutáneos *in vivo,* ayudaría a caracterizar dicho potencial. Cuando sean necesarios otros estudios, se recomienda utilizar la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos experimentales relevantes. Para sustancias no evaluadas anteriormente, se utilizará la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos necesarios para evaluar su potencial corrosivo/irritativo cutáneo. La estrategia de evaluación que se describe en este Anexo fue desarrollada por un taller de la OCDE (1) y posteriormente confirmada y ampliada por el sistema armonizado integrado de clasificación de peligros para la salud humana y efectos ambientales de las sustancias químicas *(Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances),* y fue aprobada enla reunión XXVIII del Comité Conjunto de Productos Químicos *(Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals)* en noviembre de 1998 (2).

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN

Antes de llevar a cabo los ensayos que forman parte de la estrategia de evaluación secuencial (véase la figura), se evaluará toda la información disponible, para determinar la necesidad de practicar estudios cutáneos *in vivo.* Aunque se puede obtener información significativa a partir de la evaluación de parámetros aislados (por ejemplo, un pH extremo), hay que considerar la totalidad de la información existente. Se evaluarán todos los datos relevantes sobre los efectos de la sustancia en cuestión y de sus análogos para tomar una decisión basada en la carga de la prueba, y se presentará la justificación de dicha decisión, Se hará especial hincapié en los datos existentes sobre la sustancia en seres humanos y animales, seguidos por el resultado de los ensayos *in vitro* o *ex vivo.* Siempre que sea posible se evitará realizar estudios *in vivo* con sustancias corrosivas. Los factores que se tienen en cuenta en la estrategia de evaluación son:

▼B

Evaluación de datos existentes en seres humanos y en animales (paso 1): En primer lugar se tendrán en cuenta los datos existentes sobre seres humanos, por ejemplo, estudios clínicos u ocupacionales e informes de casos, y los datos de ensayos realizados con animales, por ejemplo, de estudios sobre toxicidad de la exposición cutánea única o reiterada, pues proporcionan información directamente relacionada con los efectos producidos en la piel. No es necesario someter a estudios *in vivo* a las sustancias irritantes o corrosivas conocidas, ni a las que claramente no son lo uno ni lo otro.

Análisis de las relaciones entre las estructuras (SAR) (paso 2). Hay que tener en cuenta los resultados de los análisis de sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural, si es que existen. Cuando se dispone de suficientes datos en seres humanos o animales sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de dichas sustancias que indique su potencial corrosivo/irritativo cutáneo, se puede presuponer que la sustancia analizada producirá las mismas respuestas. En estos casos puede que no sea necesario evaluar la sustancia en cuestión. Los datos negativos de los estudios sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de estas no constituyen demostración suficiente de que una sustancia no será corrosiva ni irritante en la estrategia de evaluación secuencial. Para identificar el potencial de corrosión e irritación dérmicas hay que utilizar enfoques SAR validados y aceptados.

Propiedades fisicoquímicas y reactividad química (paso 3). Las sustancias con pH extremos, como < 2,0 y > 11,5 pueden tener potentes efectos locales. Si el pH extremo es la base para identificar si una sustancia es corrosiva para la piel, entonces también se tendrá en cuenta la reserva de ácido/álcali (o capacidad amortiguadora) (3) (4). Si la capacidad amortiguadora sugiere la posibilidad de que una sustancia no sea corrosiva para la piel se realizarán mas ensayos para confirmarlo, preferiblemente utilizando un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (véanse los pasos 5 y 6).

Toxicidad cutánea (paso 4). Si se demuestra que una sustancia química es muy tóxica por vía cutánea, puede que no sea procedente realizar un estudio sobre irritación/corrosión cutáneas *in vivo,* habida cuenta de que la cantidad de sustancia que se suele aplicar puede superar una dosis muy tóxica, lo que puede matar a los animales o infligirles graves sufrimientos. Además, cuando ya se hayan realizado estudios de toxicidad cutánea en conejos albinos hasta la dosis límites de 2 000 mg/kg de peso corporal o más sin que se haya observado irritación ni corrosión cutánea, puede que no sea necesario practicar más ensayos de irritación/corrosión cutáneas. Al evaluar la toxicidad cutánea observada en estudios realizados anteriormente hay que tener en cuenta algunas consideraciones. Por ejemplo, puede que la información publicada sobre las lesiones cutáneas no esté completa. Puede que los ensayos y las observaciones se hayan efectuado en una especie distinta del conejo, y la sensibilidad de las respuestas puede variar mucho de unas especies a otras. También puede que la forma de la sustancia analizada que se aplicó a los animales no sea la adecuada para la evaluación de la irritación/corrosión cutáneas (por ejemplo, disolución de las sustancias para los estudios sobre toxicidad cutánea) (5). Pero cuando se hayan realizado estudios sobre toxicidad cutánea bien diseñados y ejecutados en conejos, los hallazgos negativos pueden constituir prueba suficiente de que la sustancia no es corrosiva ni irritativa.

Resultados de los ensayos in vitro *o* ex vivo *(pasos 5 y 6).* Cuando se hayan demostrado las propiedades corrosivas o irritantes intensas de una sustancia en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (6) (7) diseñado para la evaluación de estos efectos concretos, no será necesario evaluarla en animales. Se puede dar por supuesto que dichas sustancias producirán similares efectos intensos *in vivo.*

▼B

Ensayo in vivo *en conejos (pasos 7 y 8)*. Si a partir de la carga de la prueba se toma la decisión de realizar un ensayo *in vivo,* se empezará con un ensayo inicial con un solo animal. Si los resultados indican que la sustancia es corrosiva para la piel no se realizarán más ensayos. Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más, durante un período de exposición de cuatro horas. Si se observa un efecto irritante en el ensayo inicial el ensayo de confirmación debe hacerse de forma secuencial, o exponiendo a otros dos animales a la vez.

REFERENCIAS

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/tests/background.hrm.

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosión. ATLA 26, 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2(1), 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.

(6) Testing Method B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483-524.

▼B

Figura

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA

	Actividad	Hallazgo	Conclusión
1	Existen datos sobre seres humanos o animales que demuestran los efectos sobre la piel o las mucosas	Corrosivo	Criterio de valoración determinante; se considera corrosiva. No es necesario evaluar.
		Irritante	Criterio de valoración determinante; se considera irritante. No es necesario evaluar.
		No corrosivo/no irritante	Criterio de valoración determinante; no se considera corrosiva ni irritante. No requiere evaluación.
	↓ *No se dispone de información, o la información disponible no es concluyente* ↓		
2	Realice evaluación SAR de la corrosión/irritación cutánea	Predice lesión grave para la piel	Se considera corrosiva. No es necesario evaluar.
		Predice irritación para la piel	Se considera irritante. No es necesario evaluar.
	↓ *No es posible hacer predicciones, o las predicciones son negativas o no concluyentes* ↓		
3	Medición del pH (tenga en cuenta la capacidad amortiguadora, si es relevante)	pH ≤ 2 o ≥ 11,5 (con elevada capacidad amortiguadora, si es relevante)	Se da por supuesto que es corrosiva. No es necesario evaluar.
	↓ *2 < pH < 11,5 o pH ≤ 2,0 o ≥ 11,5 con capacidad amortiguadora baja o nula, si es relevante* ↓		
4	Evalúe los datos de toxicidad sistémica por vía cutánea (1)	Muy tóxica	No es necesario evaluar.
		No es corrosiva ni irritante si se limita la dosis a 2000 mg/kg de peso o más, en conejos	Se da por supuesto que no es corrosiva ni irritante. No hacen falta más ensayos.
	↓ *No se dispone de tal información, o no es concluyente* ↓		
5	Efectúe ensayos de corrosión cutánea *in vitro* o *ex vivo,* validados y aceptados	Respuesta corrosiva	Se da por supuesto que es corrosiva *in vivo*. No hacen falta más ensayos.
	↓ *La sustancia no es corrosiva* ↓		
6	Efectúe ensayos de irritación cutánea *in vitro* o *ex vivo*, validados y aceptados	Respuesta irritante	Se da por supuesto que es iirritante *in vivo*. No hacen falta más ensayos.
	↓ *Aun no se dispone de métodos validados in vitro o ex vivo de evaluación de la irritación cutánea, o la sustancia no es irritante* ↓		
7	Efectúe el ensayo inicial *in vivo* con un animal	Lesión grave de la piel	Se considera corrosiva. No hacen falta más ensayos.
	↓ *No hay lesión grave* ↓		
8	Realice la prueba de confirmación con uno o dos animales adicionales	Corrosiva o irritante	Se considera corrosiva o irritante. No hacen falta más ensayos.
		Ni corrosiva ni irritante	Se considera no corrosiva ni irritante. No hacen falta más ensayos.

(1) Puede considerarse antes de los pasos 2 y 3.

▼B

B.5. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR

1. MÉTODO

Este método de evaluación es equivalente al método TG 405 de la OCDE (2002)

1.1 INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de este método actualizado se ha prestado atención especial a las posibles mejoras mediante la evaluación de toda la información existente sobre la sustancia analizada, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias y responder así a la preocupación por el bienestar de los animales. En este método se incluye la recomendación de que antes de llevar a cabo el ensayo *in vivo* que se describe para evaluar la corrosión/irritación ocular aguda de la sustancia, hay que analizar la carga de la prueba (1) que aportan los datos relevantes existentes. Si los datos disponibles son insuficientes se recomienda obtenerlos mediante la aplicación de secuencias de ensayos (2) (3). La estrategia de evaluación recomendada incluye la realización de ensayos *in vitro* validados y aceptados, y se recoge en un anexo de este método. Además se recomienda utilizar un ensayo de irritación/corrosión cutánea *in vivo* para predecir la corrosión ocular ante de realizar un ensayo ocular *in vivo.*

Por interés de la ciencia y del bienestar de los animales no se realizarán ensayos *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos relevantes sobre el potencial de corrosión/irritación ocular de la sustancia en un análisis de la carga de la prueba. Dichos datos incluirán los obtenidos en estudios existentes realizados con seres humanos o con animales de laboratorio, la demostración de corrosión/irritación por parte de una o más sustancias relacionadas estructuralmente o por una mezcla de las mismas, los que demuestran la elevada acidez o alcalinidad de la sustancia (4) (5) y los obtenidos en ensayos de corrosión e irritación cutánea *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados (6) (6a). Los estudios pueden haber sido realizado antes del análisis de la carga de la prueba, o a consecuencia de la misma.

Para ciertas sustancias dicho análisis puede indicar la necesidad de realizar estudios *in vivo* del potencial de corrosión/irritación ocular de la sustancia. En todos esos casos antes de considerar el uso de un ensayo ocular *in vivo* es preferible realizar primero un estudio de los efectos cutáneos *in vivo* de la sustancia, evaluándolo de conformidad con el método de evaluación B.4 (7). La aplicación del análisis de la carga de la prueba y la estrategia de evaluación secuencial debe reducir la necesidad de realizar ensayos *in vivo* de la corrosión/irritación oculares de aquellas sustancias de las que ya se disponga de datos de otros estudios. Si no fuera posible determinar el potencial de corrosión o irritación ocular con la estrategia de evaluación secuencial, ni siquiera tras realizar un estudio *in vivo* de la corrosión y la irritación cutáneas, se podrá llevar a cabo una evaluación de la corrosión/irritación oculares *in vivo.*

▼B

En un anexo de este método se recoge el orden recomendado para efectuar los ensayos, incluidos los ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados sobre corrosión e irritación. Se trata de una estrategia desarrollada por un taller de la OCDE, cuyos participantes la recomendaron de manera unánime (8), y ha sido adoptada como estrategia de evaluación recomendada por el sistema armonizado global para la clasificación de sustancias químicas [*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances* (CHS)] (9). Aunque dicha estrategia de evaluación secuencial no forma parte integrante del método de evaluación B.4, se recomienda seguirla antes de llevar a cabo ensayos *in vivo*. Para sustancia nuevas, es el nuevo enfoque de evaluación escalonada recomendado para obtener datos científicamente garantizados sobre la corrosión/irritación de la sustancia. Para sustancias existentes con datos insuficientes sobre su corrosión/irritación cutánea y ocular se utilizará la estrategia para obtener los datos que falten. Será necesario justificar el empleo de una estrategia o procedimiento de evaluación diferente, o la decisión de no utilizar un procedimiento escalonado.

1.2 DEFINICIONES

Irritación ocular: alteraciones en el ojo tras la aplicación de una sustancia de ensayo en la superficie anterior del ojo, completamente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación.

Corrosión ocular: lesión tisular en el ojo o grave reducción física de la vista, tras la aplicación de una sustancia de ensayo en la superficie anterior del ojo, que no son completamente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

La sustancia analizada se aplica en una sola dosis a uno de los ojos de un animal de experimentación; el ojo no tratado actúa como control. Se evalúa el grado de irritación/corrosión ocular a intervalos determinados, mediante la puntuación de las lesiones de la conjuntiva, la córnea y el iris. También se describen otros efectos en el ojo y los efectos sistémicos adversos, para proporcionar una evaluación completa de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.

Los animales que muestren signos continuados de deterioro o dolor graves en cualquier fase del ensayo deben ser sacrificados, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Los criterios para sacrificar a los animales moribundos y que sufren intensamente se recogen en la referencia (10).

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

1.4.1 **Preparación del ensayo *in vivo***

1.4.1.1 *Selección de las especies*

El conejo albino es el animal de laboratorio preferido; se emplean individuos adultos jóvenes y sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

1.4.1.2 *Preparación de los animales*

En las 24 horas previas al inicio del ensayo se examinarán los dos ojos de los animales de experimentación provisionalmente seleccionados para la misma. No se utilizarán animales que muestren irritación ocular, defectos oculares o lesión corneal preexistente.

▼B

1.4.1.3 *Condiciones de alojamiento y alimentación*

Los animales deben ser alojados de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 ºC (± 3 ºC) para los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber

1.4.2 **Procedimiento del ensayo**

1.4.2.1 *Aplicación de la sustancia analizada*

La sustancia analizada debe aplicarse a la conjuntiva de un ojo de cada animal, separando suavemente el párpado del globo ocular. A continuación se juntan suavemente los párpados durante un segundo, para que no se pierda el material. El otro ojo no se trata y sirve como control.

1.4.2.2 *Irrigación*

No se lavarán los ojos de los animales tratados hasta al menos 24 horas después de la instilación de la sustancia ensayada excepto en el caso de sólidos (véase el punto 1.4.2.3.2) y en caso de producirse efectos corrosivos o irritantes inmediatos. Transcurridas 24 horas se podrán lavar los ojos si se considera necesario.

No se recomienda utilizar un grupo satélite de animales para investigar la influencia del lavado, a menos que esté justificado desde el punto de vista estadístico. Si se necesita un grupo satélite estará formado por dos conejos. Las condiciones del lavado deben quedar minuciosamente documentadas, por ejemplo, hora del lavado; composición y temperatura de la solución de lavado; duración, volumen y velocidad de la aplicación.

1.4.2.3 *Nivel de dosis*

1.4.2.3.1 *Evaluación de líquidos*

Para evaluar líquidos se emplea una dosis de 0,1 ml. No se deben utilizar aerosoles para instilar la sustancia directamente en el ojo. Antes de aplicarlo, se expulsa el líquido del aerosol en un recipiente, y se instila 0,1 ml en el ojo.

1.4.2.3.2 *Evaluación de sólidos*

Para evaluar sólidos, cremas y sustancias con partículas, la cantidad utilizada debe tener un volumen de 0,1 ml o no pesar más de 100 mg. El material analizado debe estar reducido a polvo fino. El volumen de material sólido se medirá tras compactarlo con suavidad, por ejemplo, golpeando suavemente con los dedos el envase medidor. Si en el primer punto temporal de observación (1 hora después del tratamiento) la sustancia analizada sólida no ha sido eliminada del ojo del animal de ensayo por mecanismos fisiológicos, se puede lavar el ojo con suero salino o con agua destilada.

▼B

1.4.2.3.3 *Evaluación de aerosoles*

Se recomienda hacer una recogida de los aerosoles antes de instilar el producto en el ojo. Son excepción las sustancias que van en contenedores en aerosol presurizados, que no se pueden recoger debido a la vaporización. En esos casos hay que sujetar el ojo bien abierto, administrando la sustancia analizada en el ojo con una sola pulverización de un segundo aproximadamente, a una distancia de 10 cm directamente delante del ojo. Esta distancia puede variar dependiendo de la presión del aerosol y de su contenido. Hay que tener cuidado para no lesionar el ojo con la presión del aerosol. En determinados casos puede ser necesario evaluar el potencial de lesión «mecánica» del ojo producida por la fuerza del aerosol.

Es posible calcular la dosis de un aerosol, simulando elensayo como se indica a continuación: se pulveriza la sustancia sobre papel de pesar, a través de una abertura del tamaño del ojo de un conejo, colocada directamente delante del papel. El aumento de peso del papel sirve para calcular aproximadamente la cantidad administrada al ojo. Para sustancias volátiles se puede calcular, la dosis pesando un envase antes de aplicar el material de ensayo y después de retirarlo.

1.4.2.4 *Ensayo inicial (ensayo de irritación/corrosión ocular in vivo con un animal)*

Como ya se ha indicado en la estrategia de evaluación secuencial (véase el anexo 1), se recomienda encarecidamente realizar el ensayo *in vivo* primero con un solo animal.

Si los resultados de esta indican que la sustancia es muy irritante o corrosiva en el ojo, no se harán más ensayos.

1.4.2.5 *Anestésicos locales*

El uso de anestésicos locales se considerará caso por caso. Si el análisis de la carga de la prueba indica que la sustancia puede producir dolor, o si la evaluación inicial demuestra que se puede producir una reacción dolorosa, se podrá utilizar un anestésico local antes de aplicar la sustancia en estudio. La elección del tipo, la concentración y la dosis del anestésico local se hará con cuidado, para asegurarse de que su empleo no produce diferencias en la reacción a la sustancia en estudio. El ojo del control debe de recibir la misma anestesia.

1.4.2.6 *Ensayo de confirmación (ensayo de irritación ocular in vivo con animales adicionales)*

Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial, indicativo de un posible efecto potente (irreversible) en la de confirmación, se recomienda efectuar esta de forma secuencial exponiendo a los animales de uno a uno, en lugar de exponer a dos a la vez. Si el segundo animal presenta efectos corrosivos o irritantes importantes se suspenderá el ensayo. Puede ser necesario utilizar más animales para confirmar respuestas irritantes débiles o moderadas.

▼B

1.4.2.7 *Período de observación*

La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la reversibilidad de los efectos observados. No obstante se dará por finalizado el experimento si el cualquier momento el animal presenta signos continuados de dolor o malestar graves (9). Para determinar la reversibilidad de los efectos lo normal es someter a los animales a 21 días de observación a partir de la administración de la sustancia analizada. Si se observa la irreversibilidad antes de 21 días el experimento debe concluir en ese momento.

1.4.2.7.1 *Observaciones clínicas y graduación de las reacciones oculares*

Se examinarán los ojos 1, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de la sustancia analizada. Los animales no permanecerán en el ensayo más tiempo del necesario, una vez obtenida la información definitiva. Los animales que muestren dolor o malestar intenso continuados deben ser sacrificados sin demora, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Serán sacrificados los animales que presenten las siguientes lesiones oculares después de la instilación: perforación corneal o ulceración corneal significativa, incluido el estafiloma; presencia de sangre en la cámara anterior del ojo; opacidad corneal de grado 4 que persista durante 48 horas; ausencia de reflejo lumínico (respuesta del iris de grado 2) que persista durante 72 horas; ulceración de la conjuntiva; necrosis de la conjuntiva o de la membrana nictitante, o escarificación. Esto se debe a que tales lesiones no suelen ser reversibles.

Los animales que no presenten lesiones oculares deben permanecer en observación al menos 3 días después de la instilación. Los animales con lesiones leves a moderadas deben permanecer en observación hasta que desaparezcan las lesiones o hasta transcurridos 21 días, que es cuando finaliza el estudio. Las observaciones se efectuarán a los 7, 14 y 21 días, para determinar el estado de las lesiones y si son o no reversibles.

En cada exploración se anotará el grado de reacción ocular (conjuntiva, córnea e iris) (tabla I). También se notificará cualesquiera otras lesiones oculares (por ejemplo, queratitis vascular, manchas oculares) o efectos sistémicos adversos.

Se puede facilitar el examen de las reacciones mediante el uso de una lupa binocular, de una lámpara de hendidura manual, de un biomicroscopio o de otro dispositivo adecuado. Tras registrar las observaciones a las 24 horas, las ulteriores exploraciones pueden hacerse con la ayuda de fluoresceína.

La graduación de las respuestas oculares es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal graduación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado. La graduación de las respuestas oculares debe hacerse en condiciones ciegas.

2. **DATOS**

2.2 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las puntuaciones de la irritación ocular deben evaluarse junto con la naturaleza y la intensidad de las lesiones, y el hecho de si son reversibles o no. Las puntuaciones individuales no constituyen una referencia absoluta de las propiedades irritativas del material, pues también se evalúan otros efectos del material evaluado. En su lugar las puntuaciones individuales deben considerarse como valores de referencia, que solo serán significativos cuando sean respaldados por una descripción completa y la evaluación de todas las demás observaciones.

▼B

3. **NOTIFICACIÓN**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la siguiente información:

Justificación del ensayo *in vivo:* análisis de la carga de la prueba de ensayos realizados anteriormente, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial.

— descripción de datos relevantes de ensayos realizados anteriormente,

— datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación,

— descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos los resultados

— obtenidos con las sustancias analizadas/de referencia,

— descripción del estudio sobre irritación/corrosión cutánea *in vivo* realizado, con los resultados Obtenidos,

análisis de la carga de la prueba para realizar el estudio *in vivo.*

— Sustancia analizada:

— datos de identificación (por ejemplo, número CAS; origen; pureza; impurezas conocidas; número de lote),

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo pH, volatilidad, solubilidad, estabilidad, reacción en agua),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de los componentes, si se utiliza anestésico local, identificación, pureza, tipo, dosis y posible interacción con la sustancia analizada.

Vehículo:

— identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado,

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— especia/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos,

— edad de cada animal al principio del estudio,

— número de animales de cada sexo en los grupos de prueba y de control (en su caso),

— peso de los animales individuales al principio y al final del ensayo,

— origen de los animales, condiciones del alojamiento, dieta, etc.

Resultados:

— descripción del método utilizado para puntuar la irritación en cada momento de observación (por ejemplo, lámpara de hendidura manual, biomicroscopio, fluoresceína),

▼B

— tabulación de los datos de respuesta irritante/corrosiva de cada animal en cada momento de observación, hasta la retirada de cada animal del ensayo,

— descripción narrativa del grado y la naturaleza de la irritación o la corrosión observadas,

— descripción de otras lesiones observadas en el ojo (por ejemplo, vascularización, queratitis vascular, adherencias, manchas),

— descripción de efectos adversos locales no oculares y sistémicos, y hallazgos histopatológicos, en su caso.

Comentario de los resultados

3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La extrapolación a humanos de los resultados de los estudios de irritación ocular realizados con animales de laboratorio solo es válida en cierto grado. En muchos casos, los conejos albinos son más sensibles a los irritantes o corrosivos oculares que los seres humanos.

Hay que interpretar con cuidado los datos para excluir la irritación resultante de una infección secundaria.

4. **REFERENCIAS**

(1) Barrette, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, G, Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro, 2,* 19-26.

(5) Neun, DJ. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483 - 524.

(6a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

(7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pronunciado en Solna, Suecia, 22-24 de enero de 1996 (http://www.oecd. org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviembre de 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabla I

GRADUACIÓN DE LAS LESIONES OCULARES

Córnea

Opacidad: grado de densidad (se tendrá en cuenta la zona más densa) (*)

Sin ulceración ni opacidad	0
Zonas de opacidad diseminadas o difusas (aparte del ligero mate debido a la limpieza habitual); los detalles del iris se aprecian con claridad	1
Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos	2
Zona nacarada; no se ven detalles del iris; el tamaño de la pupila apenas es discernible	3
Córnea opaca; no se distingue el iris a su través	4

Máximo posible: 4

NOTAS

(*) Hay que tomar nota de la superficie de la opacidad corneal.

Iris

Normal	0
Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o inyección circuncorneal; iris reactivo a la luz (si la reacción es defectuosa se considera como efecto):	1
Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz	2

Máximo posible: 2

Conjuntiva

Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar; se excluye la córnea y el iris)

Normal	0
Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyectados)	1
Coloración carmesí difusa; no se distinguen fácilmente los vasos individuales	2
Coloración carne difusa	3

Máximo posible: 3

Quemosis

Inflamación (se refiere a los párpados o a las membranas nictitantes)

Normal	0
Cierta hinchazón superior a lo normal	1
Hinchazón evidente con eversión parcial de los párpados	2
Hinchazón con párpados medio cerrados	3
Hinchazón con párpados más que medio cerrados	4

Máximo posible: 4

▼B

ANEXO

Estrategia de evaluación secuencial de la irritación y la corrosión oculares

CONSIDERACIONES GENERALES

Es importante evitar el uso innecesario de animales y reducir al mínimo las pruebas que con toda probabilidad produce respuestas graves en los animales, por su bienestar y por motivos científicos. Antes de considerar la realización de ensayos *in vivo* hay que evaluar toda la información sobre una sustancia en lo que respeta a su posible poder corrosivo/irritativo ocular. Puede que existan pruebas suficientes para clasificar el potencial corrosivo o irritativo ocular de una sustancia analizada, sin necesidad de realiza ensayos con animales de laboratorio. Por eso el uso del análisis de la carga de la prueba y de una estrategia de evaluación secuencial reducirá al mínimo la necesidad de realizar ensayos *in vivo,* especialmente si es probable que la sustancia produzca reacciones graves.

Se recomienda utilizar el análisis de la carga de la prueba para evaluar la información existente sobre el potencial de irritación y corrosión oculares producidas por las sustancias, para determinar si la realización de estudios adicionales, a parte de los oculares *in vivo,* ayudaría a caracterizar dicho potencial. Cuando sean necesarios otros estudios, se recomienda utilizar la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos experimentales relevantes. Para sustancias no evaluadas anteriormente, se utilizará la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos necesarios para evaluar su potencial corrosivo/irritativo ocular. La estrategia de evaluación que se describe en este Anexo fue redactada en un taller de la OECD (1). Posteriormente fue confirmada y ampliada por el sistema armonizado integrado de clasificación de peligros para la salud humana y efectos ambientales de las sustancias químicas *(Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances),* y fue aprobada en la 1 XXVIII reunión del Comité Conjunto para productos químicos *(Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals)* en noviembre de 1998 (2).

Aunque la presente estrategia de evaluación no forma parte integrante del método de evaluación B.5, sí expresa el enfoque recomendado para la determinación de las características de irritación/corrosión oculares. Este enfoque representa la práctica óptima y una piedra angular desde el punto de vista ético para el análisis *in vivo* de la irritación/corrosión oculares. El método de evaluación proporciona instrucciones para la realización del ensayo *in vivo, y* resume los factores que se han de abordar antes de ponerla en marcha. La estrategia proporciona un enfoque basado en la carga de la prueba para la evaluación de los datos existentes sobre las propiedades de irritación/corrosión oculares de las sustancias analizadas, y un enfoque por partes para generar datos relevantes sobre sustancias que necesitan estudios adicionales o que no han sido estudiadas. La estrategia incluye la realización en primer lugar de ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados y a continuación del método de evaluación B.4 estudios de irritación/corrosión cutánea en condiciones concretas (3) (4).

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN ESCALONADA

Antes de llevar a cabo 1 los ensayos que forman parte de la estrategia de evaluación secuencial (véase la figura), se evaluará toda la información disponible, para determinar la necesidad de practicar estudios oculares *in vivo.* Aunque se puede obtener información significativa a partir de la evaluación de parámetros aislados (por ejemplo, un pH extremo), hay que considerar la totalidad de la información existente. Se evaluarán todos los datos relevantes sobre los efectos de la sustancia en cuestión y de sus análogos estructurales, para tomar una decisión basada en la carga de la prueba, y se presentará la justificación de dicha decisión. Se hará especial hincapié en los datos existentes sobre la sustancia en seres humanos y animales, seguidos por el resultado de los ensayos *in vitro* o *ex vivo.* Siempre que sea posible se evitará realizar estudios *in vivo* con sustancias corrosivas. Los factores que se tienen en cuenta en la estrategia de evaluación son:

▼B

Evaluación de datos existentes en seres humanos y en animales (paso 1): En primer lugar se tendrán en cuenta los datos existentes sobre seres humanos, por ejemplo, estudios clínicos u ocupacionales e informes de casos, y los datos de ensayos realizados con animales en estudios oftalmológicos, pues proporcionan información directamente relacionada con los efectos producidos en los ojos. A continuación se evaluarán los datos disponibles de estudios realizados con seres humanos o animales para investigar la corrosión/irritación cutáneas. Las sustancias conocidas por ser corrosivas o intensamente irritantes para el ojo no se aplicarán a los ojos de los animales, ni tampoco aquellas que tengan efectos corrosivos o irritantes para la piel; dichas sustancias debe ser consideradas corrosivas o irritantes para los ojos también. Cuando en estudios oftalmológicos realizados anteriormente se hayan obtenido pruebas suficientes de que una sustancia no es corrosiva ni imitante, tampoco será sometida a estudios oftalmológicos *in vivo.*

Análisis de las relaciones entre las estructuras (SAR) (paso 2). Hay que tener en cuenta los resultados de los análisis de sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural, si es que existen. Cuando se dispone de suficientes datos en seres humanos o animales sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de dichas sustancias que indique su potencial corrosivo/irritativo ocular, se puede presuponer que la sustancia analizada producirá las mismas respuestas. En estos casos puede que no sea necesario evaluar la sustancia en cuestión. Los datos negativos de los estudios sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de estas no constituyen demostración suficiente de que una sustancia no será corrosiva ni irritante en la estrategia de evaluación secuencial. Para identificar el potencial de corrosión e irritación dérmica y ocular hay que utilizar enfoques SAR validados y aceptados.

Propiedades fisicoquímicas y reactividad química (paso 3). Las sustancias con pH extremos, como $\leq$ 2,0 y $\geq$ 11,5 pueden tener potentes efectos locales. Si el pH extremo es la base para identificar si una sustancia es corrosiva o irritante para el ojo, entonces también se tendrá en cuenta la reserva de ácido/álcali (o capacidad amortiguadora) (3) (4). Si la capacidad amortiguadora sugiere la posibilidad de que una sustancia no sea corrosiva para el ojo se realizarán mas pruebas para confirmarlo, preferiblemente utilizando un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (véanse los pasos 5 y 6).

Consideración de otras informaciones existentes (paso 4). En esta fase se evaluará toda la información disponible sobre la toxicidad sistémica por vía cutánea. También se tendrá en cuenta la toxicidad cutánea aguda de la sustancia analizada. Si se ha demostrado que la sustancia es muy tóxica por vía cutánea puede no ser necesario estudiarla en el ojo. Aunque no existe necesariamente una relación entre la toxicidad cutánea aguda y la irritación/corrosión ocular, se puede suponer que si un agente es muy tóxico por vía cutánea también lo será si se aplica al ojo. Estos datos también se pueden tener en cuenta entre los pasos 2 y 3.

Resultados de los ensayos in vitro o *ex vivo (pasos 5 y 6).* Cuando se hayan demostrado las propiedades corrosivas o irritativas intensas de una sustancia en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* (7) (8) validado y aceptado para la evaluación concreta de la corrosión/irritación ocular o cutánea, no será necesario evaluarla en animales. Se puede dar por supuesto que dichas sustancias producirán similares efectos intensos *in vivo.* Si no se dispone de ensayos *in vitrolex vivo* validados y aceptados, debe prescindirse de los pasos 5 y 6 y pasar directamente al paso 7.

Evaluación del poder irritantivo cutáneo in vivo *de la sustancia (paso 7).* Cuando sean insuficientes los datos para realizar un análisis de la carga de la prueba concluyente sobre el poder irritante/corrosivo ocular de una sustancia a partir de los datos de los estudios que se han enumerado, se procederá en primer lugar a evaluar el potencial de irritación/corrosión cutánea *in vivo,* utilizando el método de evaluación B.4 (4) y el anexo que le acompaña (9). Si se demuestra que la sustancia produce corrosión o irritación cutánea intensa, se considerará como corrosiva para el ojo, a menos que haya otros datos en apoyo de otra conclusión. En ese caso no será necesario realizar un ensayo ocular *in vivo.* Si la sustancia no es corrosiva ni intensamente irritante para la piel, se realizará un ensayo cutáneo *in vivo.*

▼B

Ensayo in vivo *en conejos (pasos 8 y 9)*. El ensayo ocular *in vivo* empezará con un ensayo inicial con un solo animal Si los resultados de esta indican que la sustancia es muy irritante o corrosiva en el ojo, no se harán más ensayos. Si dicho ensayo no muestra efectos corrosivos ni irritantes graves, se llevará a cabo un ensayo de confirmación con otros dos animales.

REFERENCIAS

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pronunciado en Solna, Suecia, 22-24 de enero de 1996 (http://www1 oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviemre de 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro, 2,* 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483-524.

(8) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

(9) Annex to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

▼B

Figura

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR

	Actividad	Hallazgo	Conclusión
1	Existen datos sobre seres humanos o animales que demuestran los efectos sobre los ojos	Lesión grave de los ojos	Criterio de valoración principal; se considera corrosiva para los ojos. No es necesario evaluar.
		Irritante para los ojos	Criterio de valoración principal; se considera irritante para los ojos. No es necesario evaluar.
		No corrosiva/no irritante para los ojos	Criterio de valoración determinante; se considera que no es corrosiva ni irritante para los ojos. No es necesario evaluar.
	Existen datos sobre seres humanos o animales que demuestran que produce efectos corrosivos sobre la piel	Corrosiva para la piel	Se supone que es corrosiva para los ojos. No es necesario evaluar.
	Existen datos sobre seres humanos o animales que demuestran que produce efectos irritantes graves en la piel	Muy irritante para la piel	Se supone que es irritante para los ojos. No es necesario evaluar.
	↓		
	No se dispone de información, o la información disponible no es concluyente		
	↓		
2	Realice evaluación SAR de la corrosión/irritación ocular	Predice lesión grave para los ojos	Se supone que es corrosiva para los ojos. No es necesario evaluar.
		Predice irritación para los ojos	Se supone que es irritante para los ojos. No es necesario evaluar.
	Realice SAR de la corrosión cutánea	Predice corrosión cutánea	Se supone que es corrosiva para los ojos. No es necesario evaluar.
	↓		
	No es posible hacer predicciones, o las predicciones son negativas o no concluyentes		
	↓		
3	Medición del pH (tenga en cuenta la capacidad amortiguadora, si es relevante)	pH ≤ 2 o ≥ 11,5 (con elevada capacidad amortiguadora, si es relevante)	Se supone que es corrosiva para los ojos. No es necesario evaluar.
	↓		
	2< pH <] 11,5 o pH ≤ 2,0 o ≥11,5 con capacidad amortiguadora baja o nula, si es relevante		
	↓		
4	Evalúe los datos de toxicidad sistémica por vía cutánea	Muy tóxica a las concentraciones que se evaluarían en el ojo	La sustancia sería demasiado tóxica para evaluarla. No es necesario evaluar.
	↓		
	No se dispone de tal información, o la sustancia no es muy tóxica		
	↓		

▼B

5	Efectúe ensayos de corrosión ocular *in vitro* o *ex vivo*, validados y aceptados	Respuesta corrosiva	Se supone que es corrosiva para los ojos. No hacen falta más ensayos.
	↓		
	La sustancia no es corrosiva, o todavía no se dispone de métodos de evaluación in vitro *o* ex vivo *de la corrosión ocular validados*		
	↓		
6	Efectúe ensayos de irritación ocular *in vitro* o *ex vivo,* validados y aceptados	Respuesta irritante	Se supone que es irritante para los ojos. No hacen falta más ensayos.
	↓		
	La sustancia no es irritante, o todavía no se dispone de métodos de evaluación in vitro *o* ex vivo *de la irritación ocular validados*		
	↓		
7	Efectúe una evaluación experimental *in vivo* del potencial de irritación/corrosión cutánea (véase el método de evaluación B.4 y su anexo).	Respuesta corrosiva o irritante grave	Se supone que es corrosiva para los ojos. No hacen falta más ensayos.
	↓		
	La sustancia no es corrosiva si muy irritante para la piel		
	↓		
8	Efectúe el ensayo ocular inicial *in vivo* con un animal	Lesión grave de los ojos	Se considera corrosiva para los ojos. No hacen falta más ensayos.
	↓		
	No hay lesión grave o no hay respuesta		
	↓		
9	Realice el ensayo de confirmación con uno o dos animales adicionales	Corrosiva o irritante	Se considera corrosiva o irritante para los ojos. No hacen falta más ensayos.
		Ni corrosiva ni irritante	Se considera que no es irritante ni corrosiva para los ojos. No hacen falta más ensayos.

▼B

B.6. **SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Observaciones:

La sensibilidad y capacidad de los ensayos para detectar sustancias que pueden sensibilizar la piel humana se consideran importantes para un sistema de clasificación de la toxicidad aplicable a la salud pública.

No hay un método único que detecte todas las sustancias con potencial de sensibilización de la piel humana y que sea adecuado para todas las sustancias.

Para seleccionar un ensayo deben tenerse en cuenta factores como las características físicas de la sustancia, incluyendo su capacidad de penetración en la piel.

Se han elaborado dos tipos de ensayos que utilizan cobayas: los ensayos con coadyuvante, en los que se potencia un estado alérgico disolviendo o suspendiendo la sustancia estudiada en coadyuvante completo de Freund (FCA), y los ensayos sin coadyuvante.

Es probable que los ensayos con coadyuvante sean más exactos a la hora de predecir el efecto sensibilizante probable de una sustancia en la piel humana respecto a los métodos que no emplean el coadyuvante completo de Freund, por lo que son los métodos preferidos.

El ensayo de maximización en cobaya (GPMT) es un ensayo con coadyuvante ampliamente utilizado. Aunque se pueden utilizar otros métodos para detectar el potencial sensibilizante de una sustancia, se considera que el GMPT es la técnica con coadyuvante de preferencia.

Los ensayos sin coadyuvantes (suele utilizarse sobre todo el ensayo de Buehler) se consideran menos sensibles con muchas clases de productos químicos.

En ciertos casos puede haber buenas razones para escoger el ensayo de Buehler, que supone una aplicación tópica en vez de la inyección intradérmica utilizada en el ensayo de maximización en cobaya. Cuando se use el ensayo de Buehler deberá justificarse científicamente.

En el presente método se describen el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler. Se pueden utilizar otros métodos siempre que estén bien validados y se dé su justificación científica.

Si se obtiene un resultado positivo en un ensayo de cribado reconocido, podrá designarse una sustancia de ensayo como sensibilizante potencial y podrá no ser necesario realizar un nuevo ensayo con cobaya. No obstante, si se obtiene un resultado negativo en un ensayo semejante, deberá realizarse un ensayo con cobaya utilizando el procedimiento descrito en este método de ensayo.

Véase también la introducción general de la parte B.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Sensibilización de la piel (dermatitis alérgicas de contacto): es una reacción cutánea de origen inmunológico ante una sustancia. En los seres humanos las respuestas pueden caracterizarse por prurito, eritema, edema, pápulas, vesículas, ampollas o una combinación de estos fenómenos. En otras especies, las reacciones pueden ser diferentes y apreciarse solo eritema y edema.

Exposición de inducción: exposición experimental de un sujeto a una sustancia con el fin de inducir un estado de hipersensibilidad.

Período de inducción: período de al menos una semana a partir de la exposición de inducción, durante el cual puede aparecer un estado de hipersensibilidad.

Exposición de provocación: exposición experimental de un sujeto previamente tratado a una sustancia después de un período de inducción, a fin de determinar si el sujeto reacciona de forma hipersensible.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

La sensibilidad y fiabilidad de la técnica experimental utilizada deberá evaluarse cada seis meses mediante el empleo de sustancias conocidas como dermosensibilizantes suaves o moderados.

En un ensayo realizado convenientemente, el empleo de un sensibilizante suave o moderado debe producir una respuesta del 30 % al menos en un ensayo con coadyuvante y del 15 % al menos en un ensayo sin coadyuvante.

Se recomiendan las siguientes sustancias:

Número CAS	Número EINECS	Denominación EINECS	Denominación común
101-86-0	202-983-3	a-hexilcinamaldehído	ct-hexilcinamaldehído
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (mercapto-benzotiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaína	norcaína

En ciertas circunstancias se podrán utilizar otras sustancias de control que cumplan los criterios citados, justificándose debidamente su elección.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los animales utilizados se exponen inicialmente a la sustancia mediante inyecciones intradérmicas o aplicación epidérmica (exposición de inducción). Tras un período de descanso de 10 a 14 días (período de inducción), durante el que puede desarrollarse la respuesta inmunitaria, los animales se someten a una dosis de provocación. La amplitud y el grado de la reacción cutánea de los animales ante la exposición de provocación se compara con la mostrada por animales de control que reciben un tratamiento simulado durante la inducción y se someten a la exposición de provocación.

1.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Si se considera necesario eliminar la sustancia estudiada, puede hacerse utilizando agua o un disolvente adecuado que no altere la respuesta obtenida ni la integridad de la epidermis.

▼B

1.5.1. *Prueba de maximización en cobaya (GPMT)*

1.5.1.1. Preparación

Durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinas jóvenes y sanas. Antes del ensayo, los animales se eligen al azar y se asignan a los lotes de tratamiento. La eliminación del pelo se hace por corte, afeitado o incluso depilación química, en función del método de ensayo utilizado. Debe evitarse la producción de escoriaciones en la piel. Los animales se pesarán antes del ensayo y al final del mismo.

1.5.1.2. Condiciones del ensayo

1.5.1.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albina.

1.5.1.2.2. Número y sexo

Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deben ser nulíparas y no grávidas.

Se utilizan por los menos 10 animales para el lote tratado y, por lo menos, 5 para el lote testigo. Si se utilizan menos de 20 animales tratados y 10 testigos, y no es posible concluir que la sustancia estudiada sea sensibilizante, se recomienda con insistencia realizar ensayos complementarios con otros animales hasta completar un mínimo de 20 cobayas tratadas y 10 cobayas testigos.

1.5.1.2.3. Dosis

La concentración de la sustancia utilizada para cada exposición de inducción debe tolerarse bien sistemáticamente y debe ser la más elevada que produzca irritación cutánea suave o moderada. La concentración utilizada para la exposición de provocación debe ser la mayor dosis no irritante. Si necesario, las concentraciones apropiadas pueden ser determinadas a partir de un estudio piloto en el que se utilicen dos a tres animales. Debe considerarse la posibilidad de utilizar con este fin animales tratados con FCA.

1.5.1.3. Procedimiento

1.5.1.3.1. Inducción

Día 0: lote tratado

Se administran tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en la región dorsal superior, de la que se habrá eliminado el pelo, de forma que a cada lado de la linea media quede una inyección de cada par.

Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

Inyección 2: la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, en la concentración seleccionada

Inyección 3: la sustancia de ensayo en la concentración seleccionada formulada en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

En la inyección 3, las sustancias hidrosolubles se disuelven en la fase acuosa antes de mezclarse con el FCA. Las sustancias liposolubles o insolubles se suspenden en la FCA antes de combinarse con la fase acuosa. La concentración final de la sustancia de ensayo será igual a la utilizada en la inyección 2.

▼B

Las inyecciones 1 y 2 se ponen próximas entre sí y lo más cerca posible de la cabeza, mientras que la inyección 3 se aplica hacia la parte caudal de la superficie de ensayo.

Día 0: lote testigo

Se ponen tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en los mismos lugares que en los animales tratados.

Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

Inyección 2: vehículo solo

Inyección 3: formulación al 50 % (p/v) del vehículo en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico.

Días 5-7: lotes tratado y testigo

Aproximadamente 24 horas antes de la aplicación tópica de inducción, si la sustancia no es irritante de la piel, se trata la superficie de ensayo, previo corte al rape del pelo o afeitado del mismo, con 0,5 ml de lauril-sulfato sódico al 10 % en vaselina, a fin de producir irritación local.

Días 6-8: lote tratado

Se elimina de nuevo el pelo de la superficie de ensayo. Se carga totalmente un papel de filtro (2 × 4 cm) con la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, se aplica a la superficie de ensayo y se mantiene con un apósito oclusivo durante 48 horas. La elección del vehículo debe justificarse. Los productos sólidos se pulverizan finamente y se incorporan a un vehículo adecuado. Los líquidos pueden aplicarse sin diluir, en caso de que esto sea apropiado.

Días 6-8: lote testigo

Se elimina de nuevo el pelo de la superficie de ensayo. Solo se aplica el vehículo, de forma similar, en la superficie de ensayo con un apósito oclusivo durante 48 horas.

1.5.1.3.2. Provocación

Días 20-22: lotes tratado y testigo

Se elimina el pelo de los costados de los animales tratados y de los testigos. Se aplica un parche o cámara con la sustancia estudiada sobre un costado de los animales y, cuando sea pertinente, también se puede aplicar en el otro costado un parche o cámara con el vehículo solo. Los parches se mantienen con un apósito oclusivo durante 24 horas.

1.5.1.3.3. Observación y clasificación: lotes tratado y testigo

— Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se limpia la superficie de ensaya y, en caso necesario, se elimina el pelo mediante corte al rape, afeitado o depilación.

— Unas 3 horas después (hacia tas 48 horas del inicio de la aplicación de provocación) se observa la reacción cutánea y se registra de acuerdo con la clasificación que se recoge en el apéndice.

— Aproximadamente a las 24 horas de esta observación se hace una segunda observación (72 horas), que se registra igualmente.

Se recomienda la lectura ciega de los animales tratados y testigos.

En caso necesario para aclarar los resultados obtenidos con la primera provocación, debe considerarse la posibilidad de realizar, una semana después de esa primera provocación, una segunda (es decir, una «reprovocación»), cuando convenga con un nuevo lote testigo. La reprovocación también puede aplicarse al lote testigo original.

▼B

Deben observarse y registrarse, de acuerdo con la escala de Magnusson y Kligman (véase el apéndice) todas las reacciones cutáneas y cualquier observación extraña, incluidas las reacciones sistémicas, derivadas de los procesos de inducción y provocación. Para aclarar reacciones dudosas, pueden aplicarse otros procedimientos como, por ejemplo, examen histopatológico, medición del espesor del pliegue cutáneo, etc.

1.5.2. *Ensayo de Buehler*

1.5.2.1. Preparación

Durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinos jóvenes y sanos. Antes del ensayo, los animales se eligen al azar y se asignan a los lotes de tratamiento. La eliminación del pelo se hace por corte, afeitado, o incluso depilación química, en función del método de ensayo utilizado. Debe evitarse la producción de escoriaciones en la piel. Los animales se pesarán antes del ensayo y al final del mismo.

1.5.2.2. Condiciones del ensayo

1.5.2.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albina.

1.5.2.2.2. Número y sexo

Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deben ser nulíparas y no grávidas.

Se utilizan por lo menos 20 animales para el lote tratado y, por lo menos, 10 animales para el lote testigo.

1.5.2.2.3. Dosis

La concentración de sustancia de ensayo utilizada en cada exposición de inducción debe ser la más elevada posible que produzca una irritación suave pero no excesiva. La concentración utilizada para la exposición de provocación debe ser la mayor dosis no irritante. Si necesario, las concentraciones apropiadas pueden ser determinadas a partir de un estudio piloto en el que se utilicen dos o tres animales.

En caso de sustancias hidrosolubles, es conveniente utilizar agua o una solución diluida no irritante de un agente tensoactivo como vehículo. Para otros tipos de sustancias, se recomienda etanol/agua al 80 % para la inducción y acetona para la provocación.

1.5.2.3. Procedimiento

1.5.2.3.1. Inducción

Día 0: lote tratado

Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). El sistema del parche de ensayo debe cargarse totalmente con la sustancia en un vehículo adecuado (debe justificarse la elección del vehículo; las sustancias líquidas pueden aplicarse sin diluir, en caso de que sea conveniente).

El sistema del parche de ensayo se aplica a la zona de ensayo y se mantiene en contacto con la piel mediante una cámara o parche oclusivo y un apósito adecuado durante 6 horas.

▼B

El sistema del parche de ensayo debe ser oclusivo. Es apropiado utilizar una compresa de algodón, que puede ser circular o cuadrada, con una superficie aproximada de 4 a 6 cm^2. Se recomienda sujetarlo utilizando unas bridas adecuadas para garantizar la oclusión. Si se utiliza un envoltorio, puede ser necesario proceder a exposiciones complementarias.

Día 0: lote testigo

Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). Se aplica el vehículo solo de forma similar a la utilizada con el lote tratado. El sistema del parche de ensayo se mantiene en contacto con la piel mediante un parche oclusivo o cámara y un apósito adecuado durante 6 horas. Si puede demostrarse que no es necesario dar placebo al lote testigo, puede omitirse dicho tratamiento.

Días 6-8 y 13-15: lotes tratado y testigo

Se realiza la misma aplicación que en el día 0 en la misma superficie de ensayo (desprovista de pelo en caso necesario) del mismo costado el día 6-8, y de nuevo el día 13-15.

1.5.2.3.2. Provocación

Días 27-29: lotes tratado y testigo

Se elimina el pelo (mediante corte al rape) del costado no tratado de los animales tratados y testigos. Se aplica un parche oclusivo o cámara con la cantidad conveniente de sustancia, a la concentración máxima no irritante, a la parte posterior del costado sin tratar de los animales tratados y testigos.

Cuando sea pertinente, también se aplicará un parche oclusivo o cámara con vehículo solo a la parte anterior del costado sin tratar de los animales tratados y testigos. Los parches o cámaras se mantienen con un apósito adecuado durante 6 horas.

1.5.2.3.3. Observación y clasificación

— Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se elimina el pelo de la superficie de provocación.

— Unas 3 horas después (hacia las 30 horas de la aplicación del parche de provocación) se observan las reacciones cutáneas y se registran de acuerdo con la clasificación recogida en el apéndice.

— Aproximadamente a las 24 horas después de la observación de las 30 horas (hacia las 54 horas de la aplicación del parche de provocación) se vuelven a observar y registrar las reacciones cutáneas.

Se recomienda la lectura ciega de los animales tratados y testigos.

En caso necesario para aclarar los resultados obtenidos en la primera provocación, puede considerarse la realización de una segunda provocación (es decir, una «reprovocación»), en su caso con un nuevo lote testigo, a la semana de haber realizado la primera. También puede realizarse una reprovocación con el lote testigo original.

▼B

Deben observarse y registrarse con arreglo a la escala de Magnusson y Kligman (véase el apéndice) todas las reacciones cutáneas y cualquier observación extraña, incluidas las reacciones sistémicas, derivadas de los procesos de inducción y provocación. Pueden llevarse a cabo otros procedimientos como, por ejemplo, el examen histopatológico o la medida del espesor de los pliegues cutáneos, a fin de aclarar reacciones dudosas.

2. **RESULTADOS (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)**

Los resultados deben resumirse en un cuadro que indique tas reacciones cutáneas de cada animal en cada observación.

3. **INFORME (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)**

Si se realiza un ensayo de cribado, por ejemplo, ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA) o prueba de tumefacción de la oreja del ratón (MEST) antes del ensayo con cobayas, deberá darse una descripción o referencia del ensayo, con datos sobre el método, además de los resultados obtenidos con las sustancias estudiadas y de referencia.

Informe del ensayo (GPMT y ensayo de Buehler)

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

— cepa de cobaya utilizada,

— número, edad y sexo de los animales,

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— pesos de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

— técnica de preparación del lugar para el parche,

— datos de los materiales y técnica de vendaje,

— resultado del estudio piloto con sus conclusiones sobre las concentraciones de inducción y provocación que se deban utilizar en el ensayo,

— datos de la preparación, aplicación y eliminación de la sustancia estudiada,

— justificación de la elección del vehículo,

— concentraciones del vehículo y de la sustancia estudiada utilizadas para las exposiciones de inducción y provocación, y cantidad total de sustancia aplicada para la inducción y la provocación.

Resultados:

— resumen de los resultados de la última comprobación realizada de la sensibilidad y fiabilidad (véase el punto 1.3), incluida la información sobre la sustancia, la concentración y el vehículo que se hayan utilizado,

▼B

— datos de cada animal, incluido el sistema de clasificación,

— descripción de la naturaleza y grado de los efectos observados,

— las eventuales observaciones histopatológicas.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. **REFERENCIAS**

El presente método es análogo a la TG 406 de la OCDE.

▼B

Apéndice

CUADRO

Escala de clasificación de Magnusson y Kligman para evaluar las reacciones del ensayo con parche de provocación

0 = sin cambios visibles

1 = eritema ligero o en manchas localizadas

2 = eritema moderado y confluente

3 = eritema intenso y tumefacción.

▼M4

B.7. TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) EN ROEDORES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 407 de la OCDE (2008). Las directrices de ensayo 407 originales se adoptaron en 1981. En 1995 se adoptó una versión revisada con objeto de obtener nuevos datos de los animales empleados en el estudio, en particular en materia de neurotoxicidad e inmunotoxicidad.

2. En 1998, la OCDE promovió una actuación de alta prioridad orientada a revisar las directrices de ensayo existentes y desarrollar otras nuevas para la selección y evaluación de los alteradores endocrinos potenciales (8). Una faceta de esta actuación consistió en actualizar las directrices de la OCDE sobre "los estudios de toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores" (TG 407), introduciendo parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de las sustancias problema. El procedimiento se sometió a un extenso programa internacional para evaluar la pertinencia y la practicabilidad de los parámetros añadidos, la funcionalidad de estos parámetros en relación con productos químicos dotados de actividad (anti)estrogénica, (anti)androgénica y (anti)tiroidea, la reproducibilidad intra- e interlaboratorios, y la interferencia entre los nuevos parámetros y los contemplados en las TG 407 anteriores. La ingente cantidad de datos así obtenidos se ha recopilado y evaluado minuciosamente en un exhaustivo informe de la OCDE (9). El presente método de ensayo B.7 actualizado (equivalente a las directrices TG 407) es el fruto de la experiencia y de los resultados derivados del programa de investigación internacional. Este método de ensayo permite poner en relación determinados efectos de mecanismo endocrino con otros efectos toxicológicos.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El presente método de ensayo se propone investigar los efectos de toxicidad sobre una gran variedad de órganos o sistemas diana. Proporciona información acerca de los posibles riesgos para la salud derivados de la exposición continuada durante un período relativamente limitado, entre ellos los efectos sobre los sistemas nervioso, inmunitario y endocrino. En relación con estos criterios de valoración específicos, deberá identificar sustancias químicas con potencial neurotóxico que puedan justificar investigaciones futuras, o sustancias capaces de interferir en la fisiología de la glándula tiroides. También puede aportar datos sobre las sustancias químicas que afectan a los órganos reproductores masculinos o femeninos en los animales adultos jóvenes, o indicaciones sobre los efectos inmunológicos.

4. Los resultados de este método de ensayo B.7 se aplicarán a la identificación del peligro y a la evaluación del riesgo. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos se valorarán en el "Marco teórico para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos" (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) de la OCDE (11). El método describe el estudio básico de toxicidad por administración continuada que puede aplicarse en el caso de sustancias para las que no está justificado un estudio de 90 días (por ejemplo, cuando el volumen de producción no supera ciertos límites), o bien como ensayo preliminar de un estudio de toxicidad a largo plazo. La duración de la exposición será de 28 días.

▼M4

5. El programa internacional de validación de los parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina potencial de una sustancia química demostró que la calidad de los datos obtenidos mediante este método de ensayo B.7 depende en gran medida de la experiencia del laboratorio de ensayo. Esto se refiere específicamente a la determinación histopatológica de los cambios cíclicos que se producen en los órganos reproductores femeninos, así como de la determinación del peso de órganos con dependencia hormonal que son de pequeño tamaño y difícil disección. Se han puesto a punto unas directrices de histopatología (19), a las que se puede acceder a través de la página web pública de la OCDE, sobre líneas directrices. Con ella se pretende ayudar a los anatomopatólogos en sus exploraciones y aumentar la sensibilidad del ensayo. Diversos parámetros han resultado ser indicadores de la toxicidad de mediación endocrina y se han incorporado al método de ensayo. Aquellos parámetros que, en el programa de validación, dieron lugar a datos insuficientes o poco significativos sobre su eficacia para ayudar a la detección de los alteradores endocrinos se proponen como criterios de valoración opcionales (véase el apéndice 2).

6. Atendiendo a los datos generados en el proceso de validación, conviene destacar que la sensibilidad del presente ensayo no es suficiente para identificar todas las sustancias con modo de acción (anti)androgénico o (anti)estrogénico (9). Este método de ensayo no se practica en la fase de la vida más sensible a la alteración endocrina. No obstante, en el proceso de validación el método de ensayo se mostró capaz de identificar sustancias que afectan débil o intensamente a la función tiroidea, así como sustancias con actividad endocrina intensa o moderada que actúan por medio de receptores estrogénicos o androgénicos, pero en la mayoría de los casos no consiguió identificar sustancias con actividad endocrina que influyen débilmente en los receptores estrogénicos o androgénicos. Por lo tanto, no podemos definirlo como un ensayo de cribado de la actividad endocrina.

7. Por consiguiente, el hecho de no detectar efectos relacionados con estos modos de acción no se puede interpretar como prueba de la ausencia de efectos sobre el sistema endocrino. Por lo que se refiere a los efectos de mecanismo endocrino, la caracterización de la sustancia no debe basarse exclusivamente en los resultados de este método de ensayo, sino que se sopesarán de las pruebas en relación con todos los datos existentes acerca de la sustancia química para caracterizar la actividad endocrina potencial. Por este motivo, toda decisión normativa acerca de la (o la caracterización de las sustancias con) actividad endocrina ha de tener un enfoque amplio, y no basarse solamente en los resultados de la aplicación del presente método de ensayo.

8. Se entiende que todos los procedimientos relacionados con los animales serán conformes a las normas locales de bienestar animal; las descripciones de cuidado y tratamiento que se facilitan a continuación constituyen requisitos de ejecución mínimos sobre los que prevalecerá la normativa local allí donde sea más estricta. La OCDE facilita también directrices sobre el tratamiento compasivo de los animales (14).

9. En el apéndice 1 se recogen las definiciones empleadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. La sustancia problema se administra diariamente por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una misma dosis por lote durante un período de 28 días. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practicará la autopsia de los animales que mueran o reciban la eutanasia durante el estudio, y cuando este concluya se procederá a la eutanasia y autopsia de los animales supervivientes. Un estudio de 28 días proporciona información

▼M4

sobre los efectos de la exposición oral continuada y permite determinar la necesidad de realizar nuevos estudios a largo plazo. También puede aportar datos para seleccionar las concentraciones que se aplicarán en los estudios más prolongados. Los datos derivados de este método de ensayo deben permitir una caracterización toxicológica de la sustancia problema que oriente sobre la relación dosis-respuesta y permita determinar la máxima concentración sin efectos adversos observados (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

11. La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Si los parámetros especificados en el presente método de ensayo B.7 se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. Si bien es biológicamente posible que otras especies respondan a los agentes tóxicos de manera afín a la rata, el uso de especies de menor tamaño conlleva una variabilidad mayor, debido a las dificultades técnicas que plantea la disección de órganos más pequeños. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos, la única especie utilizada fue la rata. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando se realice un estudio de toxicidad oral por administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, es preferible que se utilicen en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

Alojamiento y alimentación de los animales

12. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales del cuidado de los animales de laboratorio. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. Si la sustancia problema se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta. Los animales se alojarán en pequeños grupos del mismo sexo; podrán alojarse individualmente si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de 5 animales en cada jaula.

13. Se analizará regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

Preparación de los animales

14. Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos 5 días antes de empezar el tratamiento experimental para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

Preparación de las dosis

15. La sustancia problema se administra por sonda o con el alimento o el agua de bebida. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas y toxicocinéticas de la sustancia problema.

▼M4

16. En caso necesario, se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

17. Deben utilizarse por los menos 10 animales (cinco hembras y cinco machos) por cada dosis. Si está prevista la eutanasia de algunos animales durante el ensayo, debe aumentarse el número total en una cantidad igual a la que vaya a sufrir la eutanasia antes de terminar el estudio. Puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) en los grupos de control y de dosis más elevada para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos, al menos durante los 14 días siguientes al tratamiento.

Posología

18. Generalmente, se emplean al menos tres lotes tratados y uno de control; pero si, a partir de la evaluación de otros datos, no cabe esperar ningún efecto con la dosis de 1 000 mg/kg peso corporal/día, puede realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio (con animales de la misma cepa y procedencia) para ayudar a determinar el intervalo de dosificación que debe emplearse. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia problema, el lote de control recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

19. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos o toxicocinéticos disponibles en relación con la sustancia problema o compuestos afines. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento intenso. A partir de ella, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis a fin de poner de manifiesto las posibles respuestas en función de la dosis; y como dosis más baja se escogerá la máxima dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 10) entre dosis.

20. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre las variables inmunitarias, neurológicas o endocrinas.

Ensayo límite

21. Si, en un ensayo en el que se administra un solo nivel de dosis de al menos 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración en la comida o en el agua de bebida, en el que se alcanza una concentración equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal) siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

▼M4

Administración de las dosis

22. Las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales, 7 días por semana, durante 28 días. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

23. En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren en la nutrición normal o el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en relación con el peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar.

Observaciones

24. El período de observación debe ser de 28 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite previsto para las observaciones de seguimiento durante al menos 14 días sin tratamiento, a fin de detectar la aparición retardada, la persistencia o la recuperación de los efectos tóxicos.

25. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado de salud de los animales. Se observarán todos los animales al menos dos veces el día para detectar posibles signos de morbilidad y mortalidad.

26. Todos los animales deben someterse a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (2).

27. En la cuarta semana de exposición se hará una evaluación de la reactividad sensorial frente a estímulos de diferente naturaleza (2) (estímulos auditivos, visuales y propioceptivos) (3) (4) (5), así como de la fuerza prensil (6) y de la actividad motriz (7). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

▼M4

28. Las observaciones funcionales de la cuarta semana de exposición pueden omitirse cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica (de 90 días). En este caso, las observaciones funcionales deberán incluirse en este estudio de continuación. Por otra parte, la disponibilidad de datos sobre las observaciones funcionales en el estudio de administración continuada puede facilitar la selección de las dosis utilizadas en un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica.

29. De forma excepcional, también pueden omitirse las observaciones funcionales en los lotes que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.

30. En la autopsia se podrá determinar (opcionalmente) el ciclo estral de todas las hembras tomando frotis vaginales. Estas observaciones permitirán establecer la fase del ciclo estral en el momento del sacrificio y serán de ayuda en la evaluación histológica de los tejidos sensibles a los estrógenos [véase el documento de orientación sobre histopatología (19)].

Peso corporal y consumo de alimentos y agua

31. Al menos una vez por semana se pesarán todos los animales y se calculará el consumo de alimentos. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, deberá medirse también el consumo de agua al menos semanalmente.

Hematología

32. Deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos al final del período de ensayo: hematocrito, concentraciones de hemoglobina, recuento de eritrocitos y reticulocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea. Si se sabe o sospecha que la sustancia problema o sus metabolitos potenciales tienen propiedades oxidantes, habrá que determinar además las concentraciones de metahemoglobina y de cuerpos de Heinz.

33. Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes de la eutanasia de los animales (o como parte del método de eutanasia), y conservarse en condiciones adecuadas. Los animales estarán en ayunas desde el día anterior a la eutanasia ([1]).

Bioquímica clínica

34. Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos y, especialmente, en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de la eutanasia o como parte del método de eutanasia (aparte de los moribundos o sacrificados antes de que termine el ensayo). Los parámetros medidos en el plasma y el suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltranspeptidasa, o glutamato-deshidrogenasa) y los ácidos biliares. La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de la bilirrubina puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

35. Pueden realizarse, con carácter facultativo, las siguientes determinaciones en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas.

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, el ayuno desde la víspera puede influir en el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia problema se administra con los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse análisis de bioquímica clínica después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio.

▼M4

36. Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores plasmáticos o séricos de lesiones histológicas generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia estudiada pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, triglicéridos, hormonas específicas y colinesterasa. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias químicas de determinadas clases o bien según cada caso.

37. Aunque durante la evaluación internacional de los parámetros de tipo endocrino no se pudo demostrar una clara ventaja a favor de la determinación de las hormonas tiroideas (T3, T4) y de la TSH, cuando se observen indicios de algún efecto sobre el eje hipófiso-tiroideo puede ser de utilidad conservar muestras de plasma o suero para hacer valoraciones de T3, T4 y TSH (opcionales). Estas muestras se congelan a – 20 °C para su conservación. Distintos factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:

— el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,

— el método de eutanasia, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,

— los kits de análisis hormonal, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.

El examen histopatológico es más fiable que el hormonal para llegar a una identificación definitiva de las sustancias químicos con actividad tiroidea.

38. Las muestras de plasma destinadas específicamente al análisis hormonal se obtendrán a la misma hora del día. Se recomienda contemplar la posibilidad de determinar los valores de T3, T4 y TSH basándose en las alteraciones histopatológicas del tiroides. Las cifras obtenidas al analizar concentraciones de hormonas varían con los kits comerciales que se usan para el análisis. En consecuencia, no siempre es posible establecer criterios de valoración basados en datos históricos uniformes. Por otro lado, los laboratorios procurarán mantener los coeficientes de variación por debajo de 25 en el caso de T3 y T4, y por debajo de 35 para la TSH. Todas las concentraciones se expresarán en ng/ml.

39. Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración o, preferiblemente, en un grupo de animales no incluidos en los lotes experimentales.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

40. Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimo, próstata + vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados antes de concluir el ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Al seccionar la próstata y sus anejos se procurará evitar la punción de las vesículas seminales llenas de líquido. Otra posibilidad es diseccionar y pesar las vesículas seminales y la próstata después de fijarlas.

▼M4

41. Facultativamente, otros dos tejidos se pueden pesar lo antes posible tras la disección para evitar su desecación: los ovarios pareados (peso húmedo) y el útero y cuello del útero [se ofrecen orientaciones sobre la excisión y preparación de los tejidos uterinos para determinar su peso en las TG 440 de la OCDE (18)].

42. El peso de la glándula tiroides puede determinarse (opcionalmente) después de su fijación. Su excisión se hará también de manera cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares, que comprometerían los resultados del examen histopatológico.

43. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (véase el punto 47): todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal, ojos, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, timo, tiroides, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador seguido de inmersión), gónadas (testículos y ovarios), órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimo, próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes), vagina, vejiga urinaria, ganglios linfáticos [además del ganglio más proximal debería obtenerse otro ganglio linfático, dependiendo de la experiencia del laboratorio (15)], nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, músculo esquelético y hueso con la médula ósea (una sección o médula ósea aspirada y recién montada). Se recomienda fijar los testículos mediante inmersión en fijador de Bouin o de Davidson modificado (16) (17). Con una aguja se punciona suave y superficialmente la túnica albugínea por ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema.

44. Los siguientes tejidos pueden proporcionar valiosas indicaciones sobre los efectos de carácter endocrino: gónadas (ovarios y testículos), órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimo, vesículas y glándulas seminales, próstata dorsolateral y ventral), vagina, hipófisis, glándula mamaria de machos, tiroides y cápsula suprarrenal. Las alteraciones de las glándulas mamarias de machos no se han documentado suficientemente, pero este parámetro puede ser muy sensible a las sustancias dotadas de actividad estrogénica. La observación de los órganos y tejidos que no se recogen en el punto 43 es opcional (véase el apéndice 2).

45. El documento de orientación sobre histopatología (19) proporciona más información detallada acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.

46. En el programa internacional de investigación se obtuvieron indicios en el sentido de que es posible identificar los efectos endocrinos sutiles de sustancias que tienen escasa potencia para afectar a la homeostasis de las hormonas sexuales detectando trastornos en la sincronización del ciclo estral de diversos tejidos, antes que las alteraciones histopatológicas evidentes en los órganos sexuales femeninos. Si bien no se ha obtenido una prueba definitiva de tales efectos, se recomienda tener en cuenta los signos de posible asincronía del ciclo estral a la hora de interpretar la histopatología de los ovarios (células foliculares, tecales y granulosas), el útero, el cuello y la vagina. Si se determina la fase del ciclo a partir de frotis vaginales, se podría incluir también en la comparación.

▼M4

Examen histopatológico

47. Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de todos los demás lotes tratados.

48. Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

49. Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

RESULTADOS E INFORME

Resultados

50. Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

51. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La comparación de los efectos a lo largo de un intervalo de dosis evitaría el uso de múltiples pruebas t. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

52. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar los datos previos relativos a los controles y calcular coeficientes de variación de las variables numéricas, especialmente las relacionadas con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

Informe del ensayo

53. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

Vehículo (si procede):

— Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

— Especie y cepa empleada.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

— Justificación de la especie si es distinta de la rata.

Condiciones de ensayo:

— Justificación de la selección de las dosis.

— Datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado.

▼**M4**

— Datos de la administración de la sustancia problema.

— Factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede.

— Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Parámetros opcionales

— Listado de parámetros opcionales

Resultados:

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Consumo de alimentos y de agua, si se ha medido.

— Datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad.

— Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

— Evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz.

— Pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia.

— Pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia.

— Peso corporal en el momento de la eutanasia y datos sobre el peso de los órganos.

— Observaciones de la autopsia.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas.

— Datos sobre la absorción, si los hay.

— Tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

▼M4

Apéndice 1

DEFINICIONES

Actividad antitiroidea: capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T_3) en el organismo de un mamífero.

Actividad tiroidea: capacidad de una sustancia para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T_3) en el organismo de un mamífero.

Androgenicidad: capacidad de una sustancia para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiandrogenicidad: capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiestrogenicidad: capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17-beta estradiol) en el organismo de un mamífero.

Dosis: cantidad de sustancia problema administrada. Se expresa en peso de sustancia por unidad de peso del animal y por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal/día) o en concentración constante en la dieta.

Estrogenicidad: capacidad de una sustancia química para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17-beta-estradiol) en el organismo de un mamífero.

NOAEL: sigla inglesa correspondiente a la máxima dosis sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

Posología: término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla estudiada mediante este método de ensayo.

Toxicidad evidente: término general que describe los signos claros de toxicidad que aparecen tras la administración de una sustancia problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y deben ser tales que, ante un aumento de la dosis administrada, pueda esperarse la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

Validación: procedimiento científico diseñado para caracterizar los requisitos operativos y las limitaciones de un método de ensayo y para demostrar su fiabilidad y pertinencia en relación con un propósito determinado.

▼M4

Apéndice 2

Parámetros recomendados para la detección de los alteradores endocrinos (AE) en el presente método de ensayo B.7

Parámetros obligatorios	Parámetros opcionales
Peso	
— Testículos — Epidídimo — Cápsulas suprarrenales — Próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes	— Ovarios — Útero y cuello — Tiroides
Examen histopatológico	
— Gónadas: — Testículos y — Ovarios — Órganos sexuales secundarios: — Epidídimo, — Próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes — Útero y cuello — Cápsulas suprarrenales — Tiroides — Vagina	— Frotis vaginal — Glándulas mamarias de machos — Hipófisis
Determinaciones hormonales	
	— Concentración en sangre de T3 y T4 — Concentración en sangre de TSH

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.htm1

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals Nº 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOXICIDAD SUBAGUDA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 28 DÍAS

ÍNDICE

El presente método de ensayo B.8 ha sido diseñado para caracterizar debidamente la toxicidad por inhalación de una sustancia problema después de la exposición continuada durante un período limitado (28 días), y para recabar datos que permitan hacer una evaluación cuantitativa del riesgo por inhalación. Se forman lotes de al menos 5 roedores machos y 5 hembras y se exponen 6 horas al día durante 28 días a: a) la sustancia problema a tres o más niveles de concentración; b) aire filtrado (control negativo), y/o c) el vehículo (control del vehículo). Habitualmente los animales se exponen 5 días por semana, aunque se acepta exponerlos hasta 7 días por semana. Se estudian siempre animales machos y hembras, pero pueden exponerse a diferentes niveles de concentración si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema. Este método concede al director del estudio suficiente flexibilidad para incluir lotes satélite (reversibilidad), lavados broncoalveolares (BAL), pruebas neurológicas y otras evaluaciones anatomopatológicas e histopatológicas orientadas a caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema.

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 412 de la OCDE (2009). Las directrices originales sobre ensayos de toxicidad subaguda por inhalación (TG 412) fueron adoptadas en 1981 (1). El presente método de ensayo B.8 (equivalente a las TG 412 revisadas) se ha actualizado para reflejar el estado actual de la ciencia y satisfacer las necesidades normativas actuales y futuras.

2. Este método permite caracterizar los efectos adversos que se producen después de la exposición por inhalación diaria continuada de una sustancia problema durante 28 días: Los datos derivados de los estudios de toxicidad subaguda por inhalación durante 28 días pueden servir para efectuar evaluaciones cuantitativas del riesgo [siempre que no vayan seguidos de un estudio de toxicidad subcrónica por inhalación durante 90 días (capítulo B.29 del presente anexo)]. Los mismos datos pueden además orientar en la selección de las concentraciones aplicadas en estudios más prolongados, como los de toxicidad subcrónica por inhalación durante 90 días. El presente método de ensayo no está específicamente destinado a la investigación de nanomateriales. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento GD 39 (2).

CONSIDERACIONES INICIALES

3. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema. En la selección de las concentraciones idóneas de estudio resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro,* uso(s) previsto(s) y posible exposición humana, datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de compuestos químicos estructuralmente afines, y resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda por inhalación. Si se prevé o se observa neurotoxicidad en el transcurso del estudio, el director del mismo puede decidir la incorporación de las evaluaciones pertinentes, como una batería de observación funcional (FOB) y registros de la actividad motriz: Si bien el calendario de las exposiciones en relación con las evaluaciones concretas puede ser crítico, la realización de estas actividades complementarias no debe interferir en el diseño básico del estudio.

▼M4

4. Se pueden estudiar diluciones de sustancias corrosivas o irritantes a concentraciones capaces de inducir el grado de toxicidad esperado [véase GD 39 (2)]. Al exponer los animales a estos productos, las concentraciones diana deben ser lo bastante bajas para no provocar un dolor y sufrimiento intensos, pero suficientes para obtener una curva de concentración-respuesta que satisfaga los objetivos científicos y normativos del ensayo. Dichas concentraciones se escogerán según cada caso, preferiblemente sobre la base de estudios del intervalo analítico debidamente diseñados que arrojen información sobre el parámetro principal, el umbral de irritación y el tiempo de aparición de los síntomas (véanse los puntos 11-13). Se justificará la elección de las concentraciones.

5. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales moribundos se contabilizan como muertes durante el ensayo. En el documento de orientación sobre criterios de tratamiento compasivo [Guidance Document on Humane Endpoints de la OCDE (3)] se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

6. Hay que utilizar roedores adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie preferida es la rata. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

Preparación de los animales

7. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la asignación aleatoria, los animales serán adultos jóvenes de entre 7 y 9 semanas de edad. Los pesos corporales se desviarán a lo sumo en ± 20 % del peso medio de cada sexo. Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar el ensayo, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

Zootecnia

8. Los animales se identificarán de manera individual, a ser posible con transpondedores subcutáneos, a fin de facilitar la observación y evitar confusiones. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario acostumbrar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre a través del pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. La iluminación será artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

▼M4

Cámaras de inhalación

9. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzan mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento GD 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Concentraciones límite

10. A diferencia de los estudios de toxicidad aguda, en los estudios de toxicidad subaguda por inhalación durante 28 días no hay concentraciones límite definidas. La concentración máxima estudiada dependerá de: 1) la máxima concentración alcanzable, 2) el nivel de exposición humana en "el escenario más desfavorable", 3) la necesidad de mantener un suministro de oxígeno adecuado, y/o 4) la atención al bienestar de los animales. Si no se dispone de datos de concentración límite, es aplicable el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (13) [hasta una concentración máxima de 5 mg/l para los aerosoles, de 20 mg/l para los vapores y de 20 000 ppm para los gases; véase el documento GD 39 (2)]. Cuando sea preciso superar estos límites en el estudio de gases o sustancias problemas altamente volátiles (por ejemplo, refrigerantes), habrá que justificar los motivos. La concentración límite será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

Estudio de determinación del intervalo

11. Antes de proceder al estudio principal, puede ser necesario realizar un estudio para determinar el intervalo analítico. Un estudio de determinación del intervalo es más completo que un estudio preliminar, por cuanto no se limita a la selección de las concentraciones. La información recabada en este tipo de estudio puede ser decisiva para el éxito del estudio principal. Un estudio de determinación del intervalo puede, por ejemplo, aportar información técnica referente a los métodos analíticos y a la granulometría, la detección de los mecanismos de toxicidad, los parámetros anatomopatológicos e histopatológicos, y las estimaciones de lo que podrán ser el NOAEL y la concentración tóxica mínima en un estudio principal. El director de la investigación decidirá si ha de basarse en el estudio de determinación del intervalo para identificar el umbral de irritación de las vías respiratorias (con la histopatología de las vías respiratorias, las pruebas de la función pulmonar o el lavado broncoalveolar), la concentración máxima tolerada sin causar un sufrimiento indebido a los animales y los parámetros que caractericen mejor la toxicidad de la sustancia problema.

12. Un estudio de determinación del intervalo puede hacerse con uno o más niveles de concentración. A cada nivel de concentración no deben exponerse más de tres machos y tres hembras. El estudio de determinación del intervalo tendrá una duración mínima de 5 días y máxima (generalmente) de 14 días. En el informe del estudio se justificará la selección de las concentraciones destinadas al estudio principal. La finalidad del estudio principal es demostrar una relación concentración-respuesta basada en lo que se supone el parámetro más sensible. La concentración más baja será idealmente una en la que no se observen efectos adversos, mientras que la concentración más alta será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

▼M4

13. A la hora de elegir los niveles de concentración para el estudio de determinación del intervalo, se tendrá en cuenta toda la información disponible, incluidos las relaciones entre estructura y actividad y los datos de sustancias afines (véase el punto 3). Un estudio de determinación del intervalo puede verificar o refutar los parámetros relacionados con los mecanismos de acción que *a priori* se consideran más sensibles, como la inhibición de la colinesterasa por los organofosforados, la formación de metahemoglobina por agentes eritrotóxicos, las hormonas tiroideas (T_3 y T_4), en el caso de tirotóxicos, y la presencia de proteínas, LDH, o neutrófilos en el lavado broncoalveolar en el caso de partículas inocuas escasamente solubles o de aerosoles que son irritantes pulmonares.

Estudio principal

14. El estudio principal de toxicidad subaguda comprende habitualmente tres niveles de concentración, además de lotes de control negativo (aire) y/o testigo del vehículo (véase el punto 17). Se recurrirá a todos los datos disponibles para ayudar a la selección de los niveles de exposición adecuados, incluidos los resultados de los estudios de toxicidad sistémica, metabólicos y cinéticos (poniendo especial atención para evitar niveles de concentración elevados que saturen los procesos cinéticos). Cada lote de ensayo se compone de al menos 10 roedores (5 machos y 5 hembras), que se exponen a la sustancia química estudiada 6 horas al día en un régimen de 5 días por semana durante un período de 4 semanas (la duración total del estudio es de 28 días). También se admite exponer a los animales 7 días por semana (por ejemplo, cuando se estudian productos farmacéuticos para inhalación). Si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema, podrán exponerse los dos sexos a diferentes niveles de concentración con el fin de optimizar la relación concentración-respuesta, tal como se describe en el punto 15. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificarán los motivos cuando el tiempo de exposición sea inferior a 6 horas/día o cuando sea necesario efectuar un estudio de exposición de cuerpo entero de larga duración (por ejemplo, 22 horas/día) [véase el documento GD 39 (2)]. Se privará de comida a los animales durante el período de exposición, a menos que este exceda de 6 horas. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

15. Las concentraciones diana seleccionadas deben servir para identificar el órgano o los órganos diana y para demostrar una clara relación concentración-respuesta.

— El nivel de concentración más elevado debe inducir efectos tóxicos, pero sin provocar letalidad o daños persistentes que impidan hacer una evaluación significativa.

— El nivel o los niveles de concentración intermedios se espaciarán para obtener una graduación o escala de los efectos tóxicos desde el nivel más bajo al más elevado.

— La concentración más baja debe producir escasos o nulos signos de toxicidad.

Estudio satélite (de reversibilidad)

16. Es posible recurrir a un estudio satélite (de reversibilidad) para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de toxicidad durante un período de duración adecuada, pero nunca inferior a 14 días, después del tratamiento. Los lotes satélite (de reversibilidad) se componen de 5 machos y 5 hembras, que se exponen simultáneamente a los animales de experimentación del estudio principal. Los lotes del estudio satélite (de reversibilidad) deben exponerse a la sustancia problema al nivel de concentración más elevado y, en la medida necesaria, se emplearán simultáneamente lotes testigo con aire y/o con el vehículo (véase el punto 17).

▼M4

Animales de control

17. Los animales de control negativo (con aire) simultáneo se tratan de manera idéntica a los animales del lote experimental, excepto en que se exponen al aire filtrado en lugar de a la sustancia problema. Cuando se utiliza agua o cualquier otra sustancia para ayudar a crear la atmósfera experimental, en el estudio debe incluirse un lote testigo del vehículo, en lugar del lote de control negativo (con aire). Como vehículo se usará agua en la medida de lo posible. Cuando se use agua como vehículo, los animales de control se expondrán a una atmósfera de aire con la misma humedad relativa que los grupos expuestos a la sustancia problema. La selección de un vehículo idóneo se basará en un ensayo preliminar debidamente realizado o bien en los datos históricos. Cuando no se conoce bien la toxicidad de un vehículo, el director del estudio puede decidir el uso de ambos lotes, el de control negativo (con aire) y el testigo del vehículo, pero no es en absoluto recomendable. Si los datos previos revelan que un vehículo es atóxico, no hay necesidad de emplear un grupo de control negativo (con aire), y solo se usará un lote testigo del vehículo. Si un ensayo preliminar de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada y debe utilizarse este control del vehículo.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

18. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico investigado dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará dicha sustancia durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas. Los materiales particulados pueden someterse a procesos mecánicos para reducir el tamaño de partícula. Se ofrecen más orientaciones en el documento de orientación GD 39 (2).

Distribución del tamaño de partícula

19. Se controlará la granulometría de todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 3 μm, con una desviación típica geométrica (σ_g) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (4). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Así, por ejemplo, las partículas de los humos metálicos pueden tener un tamaño inferior al mencionado intervalo, mientras que las partículas con carga y las fibras pueden superarlo.

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

20. En condiciones ideales, la sustancia problema debería estudiarse sin ningún vehículo. Si es necesario emplear un vehículo para generar una concentración de sustancia problema y un tamaño de partícula adecuados, se le dará preferencia al agua. Siempre que una sustancia problema se disuelva en un vehículo, debe demostrarse su estabilidad.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

21. El caudal de aire de la cámara de exposición se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión en tiempo real de la concentración atmosférica (o la estabilidad temporal) del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de la inhalación que resultan de interés. Si la concentración se supervisa en tiempo real, es posible reducir la

▼M4

frecuencia de medición del caudal de aire limitándola a una sola medición por exposición y día. Habrá que tomar especiales precauciones para evitar la reinspiración en las cámaras de exposición solo por la nariz. La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a respetar estos valores de referencia, habrá que medir las concentraciones de ambos gases. Si las mediciones del primer día de exposición revelan que estos gases están presentes a las concentraciones adecuadas, no serán necesarias nuevas mediciones.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

22. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. Siempre que sea posible, la humedad relativa presente en la zona de respiración de los animales, tanto en las exposiciones de solo por la nariz como en las de cuerpo entero, se supervisará de manera continua y se registrará cada hora durante la exposición. La humedad relativa debe mantenerse preferiblemente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia problema con el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

23. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara de inhalación. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

Sustancia problema: concentración real

24. La concentración real es la concentración de sustancia problema comprobada por muestreo en la zona de respiración de los animales de una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos, como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trata de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases.

25. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema durante todo el estudio, lote que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

▼M4

26. La atmósfera de exposición debe mantenerse constante en la medida de lo posible. Para demostrar la estabilidad de las condiciones de exposición se puede usar un equipo de supervisión en tiempo real, como un fotómetro de proceso para aerosoles o un analizador de hidrocarburos totales para vapores. La concentración real presente en la cámara deberá medirse al menos 3 veces por cada nivel y día de exposición. Pero si ello no es posible debido a un caudal de aire limitado o a que las concentraciones son bajas, se acepta una muestra por período de exposición. En ese caso, lo ideal es recoger la muestra durante todo el período de exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, ni en más de ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y documentará el tiempo de equilibrado (t_{95}) de la cámara. La duración de una exposición incluye el tiempo durante el cual se genera la sustancia problema. Este abarca los tiempos transcurridos hasta alcanzar el equilibrio en la cámara (t_{95}) y hasta la extinción. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} en el documento de orientación nº 39 (2).

27. Cuando se manejan mezclas muy complejas formadas por gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación. Por consiguiente, se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, por cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o del componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (2).

Sustancia problema: granulometría

28. La granulometría de los aerosoles debe determinarse al menos con periodicidad semanal por cada nivel de concentración, con ayuda de un impactador de cascada o un aparato alternativo, como un cribador de partículas. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio.

29. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis por tamaños de partícula tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia para todas las concentraciones analizadas en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir el ensayo.

30. Se controlará la granulometría en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases.

OBSERVACIONES

31. Los animales se someterán a observación clínica frecuente antes, durante y después del período de exposición. Pueden estar indicadas observaciones más frecuentes, dependiendo de la respuesta de los animales durante la exposición. Cuando la observación de los animales esté dificultada por el uso de tubos de sujeción, por la escasa iluminación de las cámaras de cuerpo entero o por la opacidad ambiental, se someterán a observación minuciosa después de la exposición. Las observaciones realizadas con anterioridad a la exposición del día siguiente permiten determinar la posible reversibilidad o exacerbación de los efectos tóxicos.

▼M4

32. Todas las observaciones se registrarán en fichas individuales de cada animal. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

33. Las observaciones en la jaula deberían incluir los cambios en la piel, ojos y membranas mucosas; los cambios en los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento. En el protocolo del estudio se pueden incluir otras evaluaciones del tipo de pruebas cinéticas, biovigilancia, pruebas de la función pulmonar, retención de materiales escasamente solubles que puedan acumularse en el tejido pulmonar y cambios comportamentales.

PESO CORPORAL

34. Se registrará el peso de cada animal poco antes de la primera exposición (día 0), y después dos veces por semana (por ejemplo, los viernes y lunes para demostrar la recuperación durante un fin de semana sin exposición, o en un intervalo que permita evaluar la toxicidad sistémica) y en el momento de la muerte o la eutanasia. Si no se observan efectos en las 2 primeras semanas, el peso corporal se podrá registrar semanalmente durante el resto del estudio. Si se utilizan animales satélite (reversibilidad), se seguirán pesando semanalmente durante todo el período de recuperación. Al concluir el estudio, se pesarán todos los animales poco antes del sacrificio para permitir calcular sin sesgos la relación entre el peso de los órganos y el peso corporal.

CONSUMO DE AGUA Y DE ALIMENTOS

35. El consumo alimentario se medirá cada semana. También se puede medir el consumo de agua.

PATOLOGÍA CLÍNICA

36. Deben hacerse evaluaciones de patología clínica en todos los animales, incluidos los testigo y los satélite (reversibilidad), cuando sean sacrificados. Se registrará el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la exposición y la toma de muestras de sangre, particularmente si la recuperación del parámetro valorado es rápida. Está indicado obtener muestras al final del período de exposición cuando se trata de parámetros con una semivida plasmática corta (por ejemplo, COHb, CHE y MetHb).

37. En el cuadro 1 se recogen los parámetros de patología clínica que se suelen exigir en todos los estudios toxicológicos. El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos. El director del estudio puede decidir la evaluación de otros parámetros para caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema (colinesterasa, lípidos, hormonas, equilibrio ácido-base, metahemoglobina o cuerpos de Heinz, creatina-cinasa, cociente mieloide/eritroide, troponinas, gases en sangre arterial, lactato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa y gamma-glutamil-transpeptidasa).

▼M4

Cuadro 1

Parámetros de patología clínica habituales

Hematología	
Recuento de eritrocitos	Recuento de leucocitos
Hematocrito	Fórmula leucocitaria
Concentración de hemoglobina	Recuento de plaquetas
Hemoglobina corpuscular media	Capacidad de coagulación (seleccionar una):
Volumen corpuscular medio	— Tiempo de protrombina
Concentración de hemoglobina corpuscular media	— Tiempo de coagulación
Reticulocitos	— Tiempo de tromboplastina parcial
Bioquímica	
Glucosa (*)	Alanina-aminotransferasa
Colesterol total	Aspartato-aminotransferasa
Triglicéridos	Fosfatasa alcalina
Nitrógeno ureico en sangre	Potasio
Bilirrubina total	Sodio
Creatinina	Calcio
Proteínas totales	Fósforo
Albúmina	Cloruros
Globulinas	
Análisis de orina (opcional)	
Aspecto (color y turbidez)	Proteínas totales
Volumen	Glucosa
Densidad y osmolalidad	Sangre/células sanguíneas
pH	

(*) Puesto que un período de ayuno prolongado puede introducir un sesgo en las determinaciones de glucosa entre los animales de control y los tratados, el director del estudio decidirá si es apropiado o no imponer dicho ayuno a los animales. Si se impone un período de ayuno, será acorde a la especie empleada; para las ratas puede ser de 16 horas (ayuno desde la víspera). La determinación de la glucosa en ayunas puede hacerse con ayuno desde la víspera durante la última semana de exposición, o bien con ayuno desde la víspera antes de proceder a la autopsia (en este último caso, con la determinación de todos los restantes parámetros de patología clínica).

38. Cuando hay indicios de que las vías respiratorias bajas (alvéolos) son el lugar principal de depósito y retención, el lavado broncoalveolar (BAL) puede ser la técnica de elección para analizar cuantitativamente los parámetros hipotéticamente dependientes de la dosis relacionados con la aparición de alveolitis, inflamación pulmonar y fosfolipidosis. Ello permite demostrar debidamente la relación dosis-respuesta y la evolución en el tiempo del daño alveolar. En el fluido BAL se puede efectuar el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, y medir las proteínas totales y la lactato deshidrogenasa. Otros parámetros dignos de tenerse en cuenta son los indicadores de daño lisosomal, fosfolipidosis, fibrosis e inflamación alérgica o irritativa, como puede ser la determinación de las citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Generalmente, las determinaciones realizadas en el BAL son complementarias de los resultados del examen histopatológico, pero no pueden sustituirlos. En el documento GD 39 (2) se facilitan indicaciones sobre el modo de realizar un lavado pulmonar.

▼M4

ANATOMÍA PATOLÓGICA MACROSCÓPICA Y PESO DE LOS ÓRGANOS

39. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a sangrado total (de ser factible) y a autopsia macroscópica. Se documentará el tiempo transcurrido entre el final de la última exposición de cada animal y su sacrificio. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de comprobar la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a una temperatura suficientemente baja para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención a las alteraciones de las vías respiratorias.

40. En el cuadro 2 se indican los órganos y tejidos que durante la autopsia macroscópica deben conservarse en un medio idóneo para su examen histopatológico. La conservación de los órganos y tejidos entre corchetes, así como de cualquier otro órgano o tejido, se hará a criterio del director del estudio. Los órganos destacados **en negrita** se deben limpiar de adherencias y pesar lo antes posible después de la disección para evitar su desecación. El tiroides y los epidídimos solo se pesarán en caso necesario, porque artefactos debidos a las adherencias pueden dificultar la evaluación histopatológica. Los tejidos y órganos se fijan en formol con amortiguador al 10 % o en otro fijador apropiado inmediatamente después de la autopsia, dejando pasar un mínimo de 24-48 horas antes de la limpieza de adherencias, dependiendo del fijador empleado.

Cuadro 2

Órganos y tejidos conservados durante la autopsia macroscópica

Cápsulas suprarrenales	Vesículas seminales
Médula ósea (y/o aspirado reciente)	Médula espinal (cervical, medio dorsal y lumbar)
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	**Bazo**
[Ojos (retina, nervio óptico) y párpados]	Estómago
Corazón	**Testículos**
Riñones	**Timo**
Laringe (3 secciones de corte histológico, 1 de ellas de la base de la epiglotis)	Tiroides
Hígado	Tráquea (como mínimo 2 secciones, 1 sección longitudinal que pase por la carina traqueal y 1 sección transversal)
Pulmón (todos los lóbulos en una sección de corte, incluidos los bronquios primarios)	[Vejiga urinaria]
Ganglios linfáticos de la región hiliar del pulmón, especialmente cuando se estudian sustancias problema particuladas escasamente solubles. Si se trata de exámenes más minuciosos o de carácter inmunológico, pueden tomarse en consideración otros ganglios linfáticos, por ejemplo de las regiones mediastínica, cervical/submandibular o auricular.	Útero
	Todas las lesiones macroscópicas
Tejidos nasofaríngeos [como mínimo 4 secciones; 1 sección incluirá el conducto nasofaríngeo y el tejido linfoide asociado a la nariz (Nasal Associated Lymphoid Tissue, NALT)]	
Esófago	
[Bulbo olfativo]	
Ovarios	

▼M4

41. El pulmón se debe extraer intacto, pesar e instilar con un fijador apropiado a una presión de 20-30 cm de agua para asegurar el mantenimiento de la estructura pulmonar (5). Se preparan cortes de todos los lóbulos a un solo nivel, incluyendo los bronquios primarios, pero, si se practica un lavado pulmonar, el lóbulo no lavado se seccionará a tres niveles (no en cortes seriados).

42. Deben examinarse como mínimo 4 secciones de los tejidos nasofaríngeos, una de los cuales incluirá el conducto nasofaríngeo (5) (6) (7) (8) (9) para permitir una observación adecuada de los epitelios escamoso, transicional (respiratorio no ciliado) y olfativo, y el tejido de drenaje linfático [NALT; (10) (11)]. Se examinarán tres secciones de la laringe, una de las cuales debe incluir la base de la epiglotis (12). Deben examinarse como mínimo 2 secciones de la tráquea, entre ellas un corte longitudinal que pase por la carina de bifurcación de los bronquios extrapulmonares y un corte transversal.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

43. La evaluación histopatológica de todos los órganos y tejidos mencionados en el cuadro 2 se llevará a cabo en el lote de control y en el de concentración más elevada, así como en todos los animales que mueran o sean sacrificados durante el estudio. Se prestará especial atención a las vías respiratorias, los órganos diana y las lesiones macroscópicas. Aquellos órganos y tejidos que presenten lesiones en el lote de concentración más elevada se examinarán en todos los grupos. Con objeto de demostrar una clara relación concentración-respuesta, el director del estudio puede decidir la realización de evaluaciones histopatológicas en otros grupos. Si se utiliza un lote satélite (reversibilidad), debe hacerse un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados. Si en el lote de exposición elevada se producen muertes prematuras u otras contrariedades que comprometan la interpretación de los datos, se practicarán evaluaciones histopatológicas en el lote de la concentración inmediatamente inferior. Se procurará correlacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

DATOS E INFORME

Datos

44. Se documentarán los datos de cada animal referentes a peso corporal, consumo de alimento, patología clínica, anatomía patológica macroscópica, peso de los órganos e histopatología. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada lote de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la autopsia. Todos los resultados, cuantitativos y fortuitos, se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido; los métodos estadísticos aplicados deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

Informe del ensayo

45. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Animales de experimentación y zootecnia

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

▼M4

— Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata. Podrán indicarse la procedencia y los datos previos, siempre que correspondan a animales sometidos a condiciones parecidas de exposición, alojamiento y alimentación.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de asignación al azar.

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación

— Descripción pormenorizada de la cámara de inhalación, incluido el volumen, y acompañada de un diagrama.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Instrumental empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente del aire y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del instrumental para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en la cámara (de cuerpo entero).

— Estabilidad de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Tratamiento del aire suministrado/extraído.

— Caudales de aire, caudal de aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

▼M4

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, mg/m^3, etc.) y no en unidades de volumen (ppm, ppmm, etc.).

— Distribución granulométrica, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σ_g), incluidos los correspondientes métodos de cálculo. Se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo

— Pormenores de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de los sólidos o preparar soluciones de la sustancia problema.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del instrumental empleado para controlar la temperatura, la humedad y el caudal de aire de la cámara (creación de una curva de calibración).

— Descripción pormenorizada del equipo empleado para tomar las muestras con el fin de medir la concentración de la cámara y la distribución por tamaño de partícula.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Método aleatorio de asignación de los animales a los lotes de exposición y de control (testigo).

— Pormenores sobre la calidad del alimento y del agua (incluido el tipo o procedencia de la alimentación y el origen del agua).

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados

— Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de granulometría, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y σ_g.

— Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).

▼M4

— Tabulación de los pesos de los animales individuales.

— Tabulación del consumo de alimentos.

— Tabulación de los datos de patología clínica.

— Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

— Tabulación de cualesquiera otros parámetros analizados.

Evaluación e interpretación de los resultados

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para satisfacer los criterios del presente método de ensayo como, por ejemplo, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

— Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre parámetros de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3).

— Se identificarán el órgano o los órganos diana.

— Se determinarán los valores de NOAEL y LOAEL.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼B

B.9. **TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) VÍA CUTÁNEA**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la introducción general de la parte B (letra A).

1.2. DEFINICIÓN

Véase la introducción general de la parte B (letra B).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia de ensayo se aplica diariamente por vía cutánea en dosis distintas a varios lotes de animales de laboratorio, utilizándose una sola dosis para cada lote, durante un período de 28 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales a fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueren durante el ensayo así como a los que sobreviven al final del mismo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, por lo menos, durante los cinco días anteriores al mismo. Antes de comenzar el ensayo, se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en lotes tratados y lotes testigo. Poco tiempo antes del ensayo se esquila la piel de la región dorsal de los animales. Se puede recurrir al rasurado, pero, en este caso, debe efectuarse unas 24 horas antes del ensayo. Suele ser necesario repetir el esquileo o el rasurado aproximadamente cada semana. Durante el esquileo o el rasurado hay que procurar no causar lesiones en la piel. La superficie que hay que despejar para aplicar la sustancia de ensayo no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Debe tenerse en cuenta el peso del animal para decidir la zona que hay que despejar y las dimensiones de la superficie que se va a tratar. Cuando la sustancia sea sólida (que, si es preciso, puede pulverizarse), deberá humedecerse con agua o, en su caso, con un vehículo apropiado, de forma que se asegure un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se utilizan generalmente sin diluir. Se procede a una aplicación diaria, entre 5 y 7 días por semana.

1.6.2. **Condiciones de ensayo**

1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

Pueden utilizarse ratas, conejos o cobayas adultos. Se pueden utilizar también otras especies pero, en este caso, se habrá de justificar su utilización.

▼B

Al principio del ensayo la diferencia de peso entre los animales no debe exceder del ± 20 % del valor medio adecuado.

1.6.2.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse al menos diez animales (5 hembras y 5 machos) de piel sana, para cada dosis. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el ensayo habrá que añadir la cantidad de animales que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con el nivel de dosis más elevado durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. *Dosis*

Se utilizan al menos tres dosis, así como un lote testigo y, en su caso, un lote testigo para el vehículo. El período mínimo de exposición será de 6 horas diarias. La sustancia de ensayo debe aplicarse todos los días a la misma hora y las dosis deben adaptarse semanalmente o bisemanalmente con objeto de conservar un nivel de dosis constante respecto al peso corporal de los animales. A excepción de la administración de las sustancias de ensayo, debe tratarse a los animales del lote testigo de la misma forma que a los de los lotes experimentales. Cuando para facilitar la administración se utilice un vehículo, este se administrará también al lote testigo, del vehículo en las mismas condiciones que a los lotes tratados; la dosis será la misma que se administre al grupo tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o solo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone de una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la dosis más baja administrada debe superar este valor. En condiciones óptimas la dosis intermedia debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias dosis intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una graduación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a dosis bajas o intermedias, así como en los lotes testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

Si la aplicación de la sustancia de ensayo provoca una irritación cutánea grave, deben reducirse las concentraciones; esto puede producir una disminución, incluso una desaparición, de otros efectos tóxicos en las dosis más elevadas. Si las lesiones cutáneas son muy graves, puede resultar necesario detener el experimento y comenzar de nuevo con concentraciones más bajas.

1.6.2.4. *Prueba límite*

Si en un experimento preliminar realizado con una dosis de 1 000 mg/kg, o con una dosis más elevada en función de una posible exposición humana (si se conoce), no se ha observado ningún efecto tóxico, puede ser innecesario continuar el experimento.

1.6.2.5. *Período de observación*

Se deben observar todos los animales diariamente con el fin de descubrir los síntomas de toxicidad. Debe registrarse el momento de la muerte, así como el momento en que aparecen y desaparecen los síntomas de toxicidad.

▼B

1.6.3. **Procedimiento**

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. En condiciones óptimas, la sustancia se administra a los animales todos los días, durante un período de 28 días. Los animales de todos los grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse en observación 14 días más, sin tratamiento, para comprobar la curación o la persistencia de los efectos tóxicos. La duración mínima de la exposición debe ser de 6 horas diarias.

La sustancia debe aplicarse uniformemente sobre una superficie equivalente más o menos al 10 % de la superficie total corporal. Cuando se trata de sustancias altamente tóxicas, la superficie cubierta puede ser menor, pero procurando que al aplicar la sustancia se forme en toda la superficie una capa lo más fina y uniforme posible.

Durante la exposición, la sustancia se mantiene en contacto con la piel mediante un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante. Además, la superficie tratada debe estar convenientemente cubierta para mantener en su sitio el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Pueden utilizarse aparatos de contención para impedir la ingestión de la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa. Puede usarse un dispositivo protector en forma de collar como método alternativo.

Al término del período de exposición, hay que eliminar cualquier residuo de sustancia, a ser posible, con agua, o con cualquier otro procedimiento adecuado de limpieza de la piel.

Deben observarse todos los animales diariamente y registrar los síntomas de toxicidad, así como el momento de su aparición, su intensidad y su duración. La observación incluirá las modificaciones del pelo y la piel, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Semanalmente deben determinarse los pesos de los animales, y se recomienda igualmente medir el consumo alimentario cada semana. Es necesario observar regularmente a los animales para procurar que no se pierdan en el experimento por razones como el canibalismo, autolisis de los tejidos o error de emplazamiento. Al término de la experiencia se practica la autopsia a todos los animales supervivientes de los lotes tratados no satélites. Los animales moribundos y los que presenten angustia o dolor graves se retirarán inmediatamente, se sacrificarán de forma humanitaria y se les practicará la autopsia.

Al terminar el ensayo se efectuarán los siguientes análisis en todos los animales (incluidos los del lote testigo):

1) análisis hematológico que incluya al menos el hematocrito, la concentración de hemoglobina, el recuento de hematíes y leucocitos, la fórmula leucocitaria, así como un estudio de la coagulación;

2) determinaciones bioquímicas clínicas de la sangre incluyendo al menos un parámetro sobre las funciones hepáticas y renal: alanina-aminotransferasa (antiguamente conocida con el nombre de glutamato-piruva to-transaminasa) y aspartato aminotransferasa (antiguamente conocido con el nombre de glutamato-oxala- ceta-to-transaminasa) del suero, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada incluyen el calcio, fósforo, cloruros, sodio, potasio, glucosa en ayunas, lípidos, hormonas, el equilibrio ácido-básico, metahemo-globina y la actividad colinesterásica.

▼B

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

1.6.4. **Autopsia general**

Se practicará una autopsia general completa a todos los animales sometidos al ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección, para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos, es decir, la piel normal y tratada, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, las glándulas suprarrenales, el corazón y los órganos diana (es decir, los que presentan lesiones importantes o modificaciones volumétricas) deben conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores.

1.6.5. **Examen histopatológico**

Hay que practicar un examen histopatológico de los órganos y tejidos que se conserven del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote testigo. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones inducidas por la sustancia de ensayo en el nivel de dosis más elevado, deben examinarse en todos los lotes que hayan estado expuestos a dosis más bajas. Los animales del lote satélite deberán someterse a un examen histológico, centrado especialmente en los órganos y tejidos en los que se hayan comprobado lesiones en los demás lotes tratados.

2. **RESULTADOS**

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote de ensayo, el número de animales al comienzo del ensayo y el número de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

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

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— datos relativos a los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.),

— condiciones de ensayo, (incluido el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),

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

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

— respuesta tóxica por sexo y dosis,

— momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido,

— efectos tóxicos u otros,

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

— cantidades de alimento y peso corporal,

— análisis hematológicos practicados y resultados,

▼B

— pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados,

— resultados de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la introducción general de la parte B (letra D).

4. **REFERENCIAS**

Véase la introducción general de la parte B (letra E).

▼B

B.10. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS IN VITRO EN MAMÍFEROS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 473 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* tiene por objeto detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo (1) (2) (3). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los rnutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que una sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. No obstante, el presente método no está pensado para medir aberraciones de ese tipo ni se emplea habitualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas *y* los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la inducción de cánceres en los seres humanos y los animales de experimentación.

En el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas, estirpes celulares o cultivos de células primarias. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad cariotípica, el número y la diversidad cromosómica *y* la frecuencia de las aberraciones cromosómicas espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien este no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca sino que se deban a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad (4) (5).

El ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, estos actúan por mecanismos distintos de la lesión directa del ADN.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o en la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

▼B

Endorreduplicación: proceso en el que, en lugar de entrar en mitosis tras la fase S de replicación del ADN, el núcleo inicia otra tase S, lo cual da lugar a cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Índice mitótico: proporción entre el número de células en metafase y el número total de células de una población celular; indica el grado de proliferación de dicha población.

Aberración numérica: un cambio en el número de cromosomas a partir del número normal propio de las células empleadas.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide *(n)* superior al diploide (3n, 4n, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones y fragmentos, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los cultivos celulares a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, tras lo cual se tratan a intervalos preestablecidos con una sustancia que detenga la divisón celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid^{R} o colchicina). Se recolectan las células, se tiñen y se observan al microscopio aquellas que se encuentren en la metafase con el fin de detectar la presencia de aberraciones cromosómicas.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Células*

Pueden emplearse líneas celulares, estirpes o cultivos de células primarias, incluidas las células humanas (fibroblastos de hámster chino, linfocitos de la sangre periférica de humanos o de otros mamíferos, etc.).

1.4.1.2. *Medios y condiciones de cultivo*

Para mantener los cultivos se emplean medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, concentración de CO_2, temperatura y humedad). En el caso de las líneas celulares establecidas y las estirpes, se comprobará regularmente la estabilidad del número cromosómico modal y la ausencia de contaminación por micoplasma. Se desecharán los cultivos contaminados. Debe conocerse la duración del ciclo celular normal de las células empleadas en esas condiciones de cultivo.

1.4.1.3. *Preparación de los cultivos*

Líneas celulares establecidas y estirpes: las células se obtienen de cultivos madre, se siembran en un medio de cultivo a una densidad a la cual los cultivos no confluyan antes del momento de la recolección y se incuban a 37 ^{o}C.

▼B

Linofocitos: se añade sangre completa tratada con un antícoagulante (por ejemplo, heparina), o bien linfocitos aislados procedentes de sujetos sanos, a un medio de cultivo que contenga un mitógeno (por ejemplo, fitohemaglutinina) y se incuba a 37 ºC.

1.4.1.4. *Activación metabólica*

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimátícos como el Aroclor 12 54 (6) (7) (8) (9) o una mezcla de fenobarbital β-naftoflavona (10) (11) (12).

La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 1 ai 10 % v/v en el medio de ensayo final. La elección del sistema de activación metabólica puede depender de la clase química de la sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial.

Son varias las técnicas —como la producción mediante ingeniería genética de líneas celulares que expresen enzimas activadoras específicas— que pueden proporcionar el potencial de activación endógena. La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente (por ejemplo, por la importancia de la isoenzima del citocromo P4 50 para el metabolismo de la sustancia de ensayo, etc.).

1.4.1.5. *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las células y la actividad de la S9. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua. Esta podrá eliminarse añadiendo un tamiz molecular,

1.4.2.2. *Concentraciones de exposición*

Para determinar la mayor concentración de exposición deben considerarse al menos los siguientes criterios: citotoxicidad, solubilidad en el sistema de ensayo y variaciones del pH o la osmolalidad.

La citotoxicidad se determinará con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la integridad y el crecimiento celular, como el grado de confluencia, el recuento de células viables o el índice mitótico. Puede ser útil determinar la citotoxicidad y la solubilidad en un experimento preliminar.

▼B

Se emplearán al menos tres concentraciones analizables. Si se produce citotoxicidad, la gama de concentraciones deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula, lo cual suele significar que la separación entre concentraciones corresponde a un factor comprendido entre 2 y 10. En el momento de la recolección, con la concentración mayor debe producirse una reducción considerable del grado de confluencia, el recuento celular o el índice mitótico (en todos los casos superior al 50 %). El índice mitótico solo constituye una medida indirecta de los efectos citotóxicos o citostáticos y está relacionado con el tiempo transcurrido desde el tratamiento. No obstante, cabe utilizar dicho índice para los cultivos en suspensión en los cuales las demás mediciones de toxicidad pueden resultar engorrosas y poco prácticas. Los datos relativos a la cinética del ciclo celular, como el tiempo medio de generación (TMG), pueden servir de información adicional. Sin embargo, el TMG es una media general que no siempre refleja la existencia de subpoblaciones que presentan retraso. Además de ello, incluso un ligero aumento del tiempo medio de generación puede asociarse a un retraso muy importante en el tiempo de mayor producción de aberraciones.

En el caso de sustancias escasamente citotóxicas, la concentración máxima de ensayo será la menor de estas tres: 5 μl/ml, 5 mg/ml o 0,01 M

En el caso de sustancias escasamente solubles que no resultan tóxicas a concentraciones inferiores al límite de solubilidad, la mayor dosis empleada deberá corresponder a una concentración superior a dicho límite en el medio de cultivo final al terminar el período de tratamiento. En algunos casos (por ejemplo, cuando se produce toxicidad únicamente con concentraciones superiores a la concentración mínima de insolubilidad), es aconsejable hacer pruebas con varias concentraciones con precipitación visible. Puede ser útil determinar la solubilidad al principio y al final del tratamiento, pues esta pueda variar durante la exposición en el sistema de ensayo debido a la presencia de células, S9, suero, etc. La insolubilidad puede detectarse por simple observación. El precipitado no debe interferir en la evaluación del resultado.

1.4.2.3. *Controles positivos y negativos*

En todos los experimentos deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo, con y sin activación metabólica. Cuando se aplique esta, la sustancia del control positivo ha de requerir activación para provocar una respuesta mutagénica.

En los controles positivos debe emplearse un clastógeno conocido con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento reproducible y detectable respecto a la frecuencia espontánea, que ponga de manifiesto la sensibilidad del sistema de ensayo.

Las concentraciones del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Activación metabólica	Sustancia	Nº CAS	Nº Einecs
Ausencia de activación metabólica exógena	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7

▼B

Activación metabólica	Sustancia	Nº CAS	Nº Einecs
	Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomicina C	50-07-7	212-072-2
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5	200-281-1
Presencia de activación metabólica exógena	Bcnzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida Monohidrato de ciclofosfamida	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán, para cada período de recolección, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo en el medio de tratamiento, y se tratarán de igual manera que los cultivos del ensayo. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior sobre controles que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.4.3. **Procedimiento**

1.4.3.1. *Tratamiento con la sustancia de ensayo*

Las células en crecimiento se tratan con la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. Los linfocitos deben empezar a tratarse unas 48 horas después de la estimulación mitogénica.

1.4.3.2. Como norma, deben prepararse dos cultivos para cada concentración y se recomienda seriamente hacer lo propio en el caso de los controles negativos o el disolvente. Sí se demuestra, sobre la base de datos anteriores, que la diferencia entre los dos cultivos es mínima (13) (14), puede bastar un solo cultivo para cada concentración.

Las sustancias gaseosas o volátiles han de someterse a ensayo con métodos adecuados (recipientes de cultivo herméticos, etc.) (15) (16).

1.4.3.3. *Recolección de las células*

En el primer experimento se exponen las células a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, durante 3 a 6 horas. Se toma una muestra transcurrido un período, desde el inicio del tratamiento, de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (12). Si este protocolo da resultados negativos con y sin activación, debe efectuarse otro experimento sin activación, pero con tratamiento continuo hasta que se tome la muestra tras un período de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal. Algunas sustancias químicas se detectan mejor con un tiempo de tratamiento y toma de muestra superior a dicho período. La obtención de resultados negativos en presencia de activación metabólica debe confirmarse caso por caso. Si dicha confirmación no se considera necesaria, debe justificarse.

▼B

1.4.3.4. *Preparación de los cromosomas*

Se tratan los cultivos celulares con Colcemid[R] o colchicina por lo general durante un período de 1 a 3 horas antes de la recolección. Los cultivos celulares se recolectan y procesan por separado para preparar los cromosomas. Dicha preparación incluye el tratamiento hipotónico de las células, la fijación y la tinción.

1.4.3.5. *Análisis*

Antes de analizarlas al microscopio, se asignará un código independiente a cada preparación, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, todos los tipos de células analizadas deben contener un número de centrómeros igual al número modal ± 2. Deben analizarse al menos 200 metafases bien extendidas en cada concentración y control y, en su caso, repartidas de forma equilibrada entre los cultivos dobles. La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones.

Pese a que el objeto del ensayo consiste en detectar aberraciones cromosómicas estructurales, es importante registrar los posibles casos de poliploidía y endorreduplicación.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Dado que la unidad experimental es la célula, se evaluará el porcentaje de estas que presenta aberraciones cromosómicas estructurales. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los cultivos experimentales y los controles. Los *gaps* se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones.

Asimismo, se registrarán las determinaciones de citotoxicidad realizadas en paralelo en todos los cultivos tratados y los controles negativos de los principales experimentos sobre aberraciones.

Se proporcionarán los datos relativos a cada cultivo y se resumirán en forma de tabla.

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. En el punto 1.4.3.3 se trata la pertinencia de confirmar los resultados negativos. En los experimentos ulteriores se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentra la separación entre concentraciones y las condiciones de activación metabólica.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración o aumento reproducible del número de células que presentan aberraciones cromosómicas, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (3) (13). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

▼B

El aumento del número de células poliploides puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir procesos mitóticos y de producir aberraciones cromosómicas numéricas. El aumento del número de células con cromosomas endorreduplicados puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular (17) (18).

No se considerarán mutágenas en el sistema de ensayo las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas estructurales en los cultivos de células somáticas de mamífero. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en los cultivos de células somáticas de mamífero.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

— tipo y procedencia,

— características del cariotipo e idoneidad del tipo de células empleadas,

— ausencia de micoplasma, si procede,

— información sobre la duración del ciclo celular,

— sexo de los donantes de sangre, sangre completa o linfocitos aislados y mitógeno empleado,

— número de pases, si procede,

— métodos de mantenimiento del cultivo celular, si procede,

— número modal de cromosomas.

Condiciones del ensayo:

— sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración de la exposición de las células,

— fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos (datos relativos a la citotoxicidad, límites de solubilidad, si se conocen, etc.),

— composición del medio, concentración de CO_2, si procede,

▼B

— concentración de la sustancia de ensayo,

— volumen de vehículo y de sustancia de ensayo añadida,

— temperatura de incubación,

— tiempo de incubación,

— duración del tratamiento,

— densidad celular en el momento de la siembra, si procede,

— tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,

— controles positivos y negativos,

— métodos de preparación de los portaobjetos,

— criterios de recuento de las aberraciones,

— número de metafases analizadas,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios empleadas para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o ambiguos.

Resultados:

— signos de toxicidad (grado de confluencia, datos del ciclo celular, recuentos celulares, índice mitótico, etc.),

— signos de precipitación,

— datos sobre el pH y la osmolalidad del medio de tratamiento, si se han determinado,

— definición de las aberraciones, incluidos los *gaps*,

— número de células que presentan aberraciones cromosómicas e indicación por separado del tipo de dichas aberraciones en cada cultivo tratado y cada control,

— variaciones de la ploidía, en su caso,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos, si se han realizado,

— datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo,

— datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Evans, H,). (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical* mutagens, Principies *and Methods for their Detection,* Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vítro* Chromosomal Aberration Test Using Chínese Hams ter Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research,* Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427–432.

▼B

(3) Calloway, S. M, Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brovvn, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Nakamura, R. Ahmed, M, Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1–175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.,* 257, pp. 147—204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res., 268,* pp. 297–305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagcnicity Test, Mutation *Res,. 31,* pp. 347–364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.. 113.* pp. 173–215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro, }.* Induction of Chro mosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.,* 37, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. {1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, Mutation Res., *66,* pp. 277–290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R., D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay,]. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced *S9* in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 175–177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro Metabolic Activation in *Mutagenesis* Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M.]., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L, Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation *Res., 312,* pp. 241–261.

(13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analy sis of Data from *In* Vitro Cytogenetic Assays, in: Statistical *Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res., 312,* pp. 139–149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, pp. 91–103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A, P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Muta tion Assay, *Environmental Mutagenesis, 5,* pp. 795–801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster ceils during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.. 119.* pp. 403–413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (198 3), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, pp. 1362–1364.

▼B

B.11. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS IN VIVO EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

El presente método reproduce tas directrices del documento OCDE TG 475 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas in *vivo* en mamíferos se realiza para detectar aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por la sustancia de ensayo en células de médula ósea de animales —por lo general roedores— (1) (2) (3) (4). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. Un aumento de la poliploidía puede indicar que sustancia química es capaz de inducir aberraciones numéricas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados que provocan alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores guardan relación con el cáncer en los seres humanos y los sistemas experimentales.

En este ensayo se utilizan habitualmente roedores. El tejido diana es la médula ósea por estar muy vascularizada y por contener una poblicación de células de ciclo corto que pueden aislarse y tratarse con facilidad. En el presente método no se consideran otras especies ni otros tejidos diana.

El presente ensayo de aberraciones cromosómicas está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagenico, pues permite tomar en consideración factores del metabolismo in vivo, de la toxicocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie y el tejido. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Endorreduplicación: proceso en el que, en lugar de entrar en mitosis tras la fase S de replicación del ADN, el núcleo inicia otra fase S, lo cual da lugar a cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Aberración numérica: número de cromosomas distinto del número normal propio de las células empleadas.

▼B

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide *(n)* superior al díploide (3n, 4n, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones y fragmentos, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada y se sacrifican a intervalos apropiados tras el tratamiento. Antes de sacrificarlos, se les administra una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid^{R}). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células de médula ósea y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Selección de la especie animal*

Si bien suelen emplearse la rata, el ratón y el hámster chino, puede utilizarse otra especie de mamíferos apropiada. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ±20 % del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. *Alojamiento y alimentación de los animales*

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3. *Preparación de los animales*

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días.

1.4.1.4. *Preparación de las dosis*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestran que es posible conservarlas.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

▼B

1.4.2.2. *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en ambos sexos y en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían producirse aberraciones estructurales *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo *y* la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	Nº CAS	Nº Einecs
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida Monohidrato de ciclofosfamida	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trictilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con aberraciones cromosómicas aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Si se hace una sola toma de muestras en los controles negativos, el momento más oportuno para hacerla es tras el primer período de muestreo. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

Los lotes tratados y los controles han de estar compuestos al menos por cinco hembras y cinco machos analizables cada uno. Sí en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. **Pauta de tratamiento**

Las sustancias de ensayo se administran preferiblemente en una sola vez, aunque también puede dividirse la dosis —por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo— con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades. Si se siguen otras pautas debe justificarse científicamente.

▼B

Se toman dos muestras en momentos distintos tras el tratamiento administrado en un día. En el caso de los roedores, la primera muestra se toma transcurrido un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (este suele durar de 12 a 18 horas) desde el tratamiento. Dado que el tiempo necesario para que la sustancia de ensayo se asimile y se metabolice, así como el efecto de esta sobre la cinética del ciclo celular pueden modificar el momento óptimo para detectar aberraciones cromosómicas, se recomienda tomar otra muestra 24 horas después de la primera. Si se siguen pautas de más de un día, ha de tomarse una muestra transcurrido un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular normal desde la última administración.

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se extraen las muestras transcurrido un plazo oportuna, que en el caso de los ratones es de unas tres a cinco horas y en el de los hámsters chinos, de unas cuatro a cinco horas. Se toman las células de la médula ósea y se analizan en busca de aberraciones cromosómicas.

1.5.3. **Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal (5). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el período de muestreo posterior se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por «dosis máxima» la que produzca tales signos de toxicidad que si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría probablemente letal. Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, reducción del índice mitótico superior al 50 %).

1.5.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a este. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

▼B

1.5.6. **Preparación de los cromosomas**

Se extrae la médula ósea inmediatamente después del sacrificio, se trata con una solución hipotónica y se fija. A continuación, se extienden las células en portaobjetos y se tiñen.

1.5.7. **Análisis**

Se evalúa la citotoxícidad determinando el índice mitótico en un mínimo de 1 000 células por animal, en todos los animales tratados (incluidos los controles positivos) y en los controles negativos sin tratar.

Deben analizarse al menos 100 células de cada animal. La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones. Antes de analizarlas al microscopio, se asigna un código independiente a cada portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de preparación de los portaobjetos provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, las células analizadas deben contener un número de centrómeros igual a $2n + 2$.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Se determinará en cada animal la cantidad de células analizadas, el número de aberraciones por célula y el porcentaje de células que presentan aberraciones cromosómicas estructurales. Se hará una relación de los distintos tipos, el número *y* la frecuencia de dichas aberraciones en los lotes tratados y los controles. Los *gaps* se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos relativos a ambos sexos pueden considerarse conjuntamente en el análisis estadístico.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento de la proporción de células con aberraciones cromosómicas relacionado con la dosis, claro aumento del número de células que presentan aberraciones en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (6). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales.

El aumento de la poliploidía puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de producir aberraciones cromosómicas numéricas. El aumento de la endorreduplicación puede indicar que la sustancia de ensayo es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular (7) (8).

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

▼B

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas en la médula ósea de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en la médula ósea de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos pasen al torrente circulatorio o lleguen específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,

— peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

— controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),

— datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,

— fundamento de la selección de la dosis,

— preparación de la sustancia de ensayo,

— administración de la sustancia de ensayo,

— fundamento de la elección de la vía de administración,

— métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,

— conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,

— calidad de los alimentos y el agua,

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

▼B

— sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del trata miento,

— métodos de preparación de los portaobjetos,

— criterios de recuento de las aberraciones,

— número de células analizadas por animal,

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

— signos de toxicidad,

— índice mitótico,

— tipo y número de aberraciones observadas en cada animal,

— número total de aberraciones por lote, medias y desviaciones estándar,

— número de células con aberraciones por lote, medias y desviaciones estándar,

— variaciones de la ploidía, en su caso,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos, si se han realizado,

— datos de los controles negativos realizados en paralelo,

— datos sobre controles históricos negativos, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— datos de los controles positivos realizados en paralelo.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Adler, 1. D. (1984), Cytogcnetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C, pp. 275–306.

(2) Presten, R.)., Dean, B, J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res., 189,* 157–165.

(3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogcnetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic *Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Pan (revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.,* 312, pp. 305-312.

(5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Muta-genesis, 7,* pp. 31 3-319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: UKEMS *Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Repon Pan (III. Statistical Evahation of Mutagenicity Test Data,* D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res. 119,* pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res., 43,* pp. 1363-1364.

▼B

B.12. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 474 sobre el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general, roedores).

El ensayo de micronúcleos tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados.

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas.

En este ensayo se emplea habitualmente médula ósea de roedores, pues es en ese tejido donde se forman los eritrocitos policromáticos. La detección de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromérico en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros (policromáticos) micronucleados. Si los animales se tratan de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede emplearse como parámetro en el ensayo el número de eritrocitos maduros (normocromáticos) con micronúcleos en la sangre periférica respecto a un número determinado de eritrocitos maduros.

El presente ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo,* de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro.*

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Centrómero (cinetocoro): región (o regiones) del cromosoma que se asocia a las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

Micronúcleo: núcleo pequeño, adicional al núcleo celular principal y separado de él, y producido durante la telofase de la mitosis o la meiosis por fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros retardados.

Eritrocito normocromático: eritrocito maduro que carece de ribosomas y que se distingue del eritrocito policromático (inmaduro) mediante tinción selectiva de los ribosomas.

Eritrocito policromático: eritrocito inmaduro, en una fase intermedia de transformación, que aún tiene ribosomas y puede, por tanto, distinguirse del eritrocito normocromático (maduro) mediante tinción selectiva de dichos orgánulos.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada. Si se utiliza médula ósea, se sacrifican los animales a intervalos apropiados tras el tratamiento, se extrae la médula ósea, se preparan los portaobjetos y se tiñen (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Si se emplea sangre periférica, se extrae a intervalos apropiados tras el tratamiento, se preparan frotis y se tiñen (4) (8) (9) (10). En los estudios con sangre periférica las células deben recolectarse lo antes posible después de la última exposición. Se analizan las preparaciones para detectar la presencia de micronúcleos.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Selección de la especie animal*

Si se emplea médula ósea, se recomienda el uso de ratones o ratas, pero también pueden utilizarse otras especies de mamíferos adecuadas. Si se emplea sangre periférica, se recomienda el uso de ratones. Ahora bien, puede utilizarse cualquier otro mamífero adecuado, siempre que se trate de una especie en la que el bazo no elimine los eritrocitos micronucleados o en la que se haya demostrado una sensibilidad adecuada para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Deben usarse animales jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. *Alojamiento y alimentación de los animales*

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

▼B

1.4.1.3. *Preparación de los animales*

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes control. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos.

1.4.1.4. *Preparación de las dosis*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2. *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en ambos sexos y en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían formarse micronúcleos *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia del control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	N° CAS	N° Einecs
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
N-etilo-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Cidofosfamida Monohidrato de ciclofosfamida	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

▼B

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con micronúdeos aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Si se hace una sola toma de muestras en los controles negativos, el momento más oportuno para hacerla es tras el primer período de muestreo. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

Si se emplea sangre periférica, puede aceptarse como control negativo en paralelo una muestra previa al tratamiento, pero únicamente en los estudios cortos (por ejemplo, de una a tres administraciones), si los resultados se encuentran en el intervalo previsto según controles anteriores.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

Cada lote tratado y cada control ha de estar compuesto al menos por cinco hembras y cinco machos analizables (11). Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo. En caso de que la exposición humana a las sustancias pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. **Pauta de tratamiento**

No se recomienda ninguna pauta normalizada (una, dos o más administraciones a intervalos de 24 horas, etc.). Pueden aceptarse muestras tomadas en el marco de estudios de larga duración siempre que se haya demostrado que ese tipo de estudio proporciona resultados positivos o, si los resultados son negativos, que ha habido toxicidad o bien que se ha estado aplicando la dosis límite hasta el momento de tomar la muestra. También puede dividirse la dosis —por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo— con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades.

El ensayo puede realizarse de dos maneras:

a) se administra la sustancia de ensayo a los animales en una sola vez. Se extraen muestras de la médula ósea al menos dos veces, la primera de ellas cuando hayan transcurrido más de 24 horas, pero menos de 48 horas desde el tratamiento. Debe respetarse un intervalo adecuado entre las tomas. Si se extraen muestras antes de que transcurran 24 horas desde el tratamiento, deberá justificarse. Las muestras de sangre periférica han de tomarse al menos en dos ocasiones, la primera de ellas cuando haya transcurrido un mínimo de 36 horas desde el tratamiento. Tras la primera toma, se respetan intervalos adecuados, sin sobrepasar las 72 horas. Si se observa una respuesta positiva en una toma de muestras, no es preciso realizar más;

▼B

b) si se efectúan dos o más administraciones diarias (por ejemplo, dos o más administraciones a intervalos de 24 horas), ha de tomarse una muestra transcurridas de 18 a 24 horas desde la última administración si se trata de médula ósea, y de 36 a 48 horas desde la última administración en el caso de la sangre periférica (12).

Si procede, pueden aplicarse otros tiempos de muestreo adicionales.

1.5.3. **Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal (13). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el último período de muestreo se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por «dosis máxima» la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo, resultaría probablemente letal. Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitógenos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, reducción de la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos en la médula ósea o la sangre periférica).

1.5.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. En el caso de estudios de mayor duración, la dosis límite será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure hasta 14 días y de 1 000 mg/kg de peso corporal/día cuando el tratamiento dure más de 14 días. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a este. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

▼B

1.5.6. **Preparación de la médula ósea o la sangre periférica**

Por lo general, la médula ósea se extrae del fémur o la tibia de los animales recién sacrificados. Las células suelen tomarse del fémur o la tibia, se preparan y se tiñen según métodos establecidos. La sangre periférica se extrae de la vena caudal o de otro vaso sanguíneo adecuado. Las células hemáticas se someten inmediatamente a una tinción supravital (8) (9) (10) o se extienden en frotis y luego se tiñen. Si se emplea un colorante específico del ADN [por ejemplo, naranja de acridina (14) o Hoechst 33258 más pironina-Y (15)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN, pero no por ello han de descartarse los colorantes convencionales (coloración de Giemsa, etc.). También pueden utilizarse otros sistemas [por ejemplo, columnas de celulosa para eliminar las células nucleadas (16)], siempre que se tenga constancia de que resultan adecuados para la preparación de micronúcleos en laboratorio.

1.5.7. **Análisis**

Para cada animal, se determina la relación entre los eritrocitos inmaduros y el total de eritrocitos (inmaduros + maduros) en un recuento de al menos 200 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 1 000 si se trata de sangre periférica (17). Antes de analizarlos al microscopio, se codifican independientemente todos los portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Se determinará la cantidad de eritrocitos inmaduros micronucleados en un mínimo de 2 000 eritrocitos inmaduros por animal. Puede obtenerse más información contando los eritrocitos maduros con micronúcleos. En el análisis de los portaobjetos la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos no debe ser inferior al 20 % del valor del control. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede determinarse la cantidad de micronúcleos en un mínimo de 2 000 eritrocitos maduros por animal. Pueden emplearse sistemas de análisis automatizados (análisis de la imagen o citometría de flujo continua de suspensiones celulares) en lugar del recuento manual, siempre que estén debidamente justificados y validados.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Para cada animal analizado se relacionará por separado el número de eritrocitos inmaduros, el de eritrocitos inmaduros micronucleados y la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, se proporcionarán también los datos relativos a los eritrocitos maduros, caso de haberse recogido. Se facilitarán, para cada animal, la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de los mismos y, si procede, el porcentaje de eritrocitos micronucleados. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos relativos a ambos sexos pueden considerarse conjuntamente en el análisis estadístico.

▼B

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento del número de células micronu-cleadas relacionado con la dosis, claro aumento del número de dichas células en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (18) (19). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales.

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de micronúcleos indica que la sustancia de ensayo induce la formación de micronúcleos, que son consecuencia de una lesión de los cromosomas o del aparato mitótico de los eritro-blastos de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no induce la formación de micronúdeos en los eritrocitos inmaduros de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos pasen al torrente circulatorio o lleguen específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,

— peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

— datos de los controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),

— datos relativos al estudio de determinación del intervalo de dosis, si se ha llevado a cabo,

▼B

— fundamento de la selección de la dosis,

— preparación de la sustancia de ensayo,

— administración de la sustancia de ensayo,

— fundamento de la elección de la vía de administración,

— métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,

— conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,

— calidad de los alimentos y el agua,

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de preparación de los portaobjetos,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios de recuento de los eritrocitos inmaduros micronucleados,

— número de células analizadas por animal,

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

— signos de toxicidad,

— proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos,

— número de eritrocitos inmaduros micronucleados observados en cada animal,

— media ± desviación estándar de eritrocitos inmaduros micronucleados de cada lote,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos y métodos aplicados,

— datos de los controles históricos negativos y los realizados en paralelo al ensayo,

— datos de los controles positivos realizados en paralelo.

— Discusión de los resultados.

— Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.,* 18, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, pp. 9-15,

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, Mutation *Res. 123,* pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, pp. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983). Micronuclei in CircuLating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology,* ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G, H., Ramel, C. Salamone, M. R. Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.,* 189, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol. 14, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, Mutation Res., 245, pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Repon of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JKMMS, MMS, Mutation *Res., 278,* pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, pp. 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo,* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, Mutation Res., 312, pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalised sampling time of 30±6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, pp. 313-319.

(13) Fielder, R. J., Alien, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, C., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis,* 7, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res., 120,* pp. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, pp. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mututton Res., 213, pp. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 347, pp. 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L (1990), *In Vivo* Cytogenotics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenícity Testing. Report, Part 1, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evalualion of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Commiltec on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.13/14. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN INVERSA EN BACTERIAS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 471 sobre el ensayo de mutación inversa en bacterias (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

En el ensayo de mutación inversa en bacterias se emplean cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* auxotróficas respecto a un aminoácido para detectar mutaciones puntuales que impliquen sustitución, adición o deleción de uno o varios pares de bases del ADN (1) (2) (3). El ensayo se fundamenta en la detección de mutaciones que revierten mutaciones presentes en las cepas experimentales y restablecen la capacidad funcional de las bacterias de sintetizar un aminoácido esencial. Las bacterias revertientes se detectan por su capacidad de crecer en ausencia del aminoácido que la cepa experimental parental no es capaz de sintetizar.

Las mutaciones puntuales ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas. Además de ello, son muchas las pruebas de que dichas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores de las células somáticas intervienen en la formación de tumores en los seres humanos y los animales de experimentación. El ensayo de mutación inversa en bacterias es rápido, poco costoso y relativamente sencillo de realizar. Muchas de las cepas experimentales presentan algunas características que las hacen más sensibles para la detección de mutaciones: secuencias de ADN sensibles en los sitios de reversión, mayor permeabilidad celular a las moléculas grandes y eliminación de sistemas de reparación del ADN o intensificación de los procesos de reparación del ADN propensos a errores. La especificidad de las cepas experimentales puede proporcionar información útil sobre los tipos de mutaciones inducidas por sustancias genotóxicas. Existe una importante base de datos relativa a una gran variedad de estructuras que recoge los resultados de ensayos de mutación inversa en bacterias. Asimismo, se han desarrollado metodologías bien consolidadas para analizar productos químicos, incluidos los compuestos volátiles, con diferentes propiedades fisicoquímicas.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Ensayo de mutación inversa en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli:* ensayo que permite detectar una mutación en una cepa auxótrofa para un aminoácido (histidina y triptófano, respectivamente), que la transforma en una cepa independiente del aporte externo de dicho aminoácido.

Mutágenos que provocan la sustitución de un par de bases: agentes que provocan el cambio de una base en el ADN. En un ensayo de reversión el cambio puede producirse en el sitio de la mutación original o en un segundo sitio del genoma bacteriano.

Mutágenos que desplazan el marco de lectura: agentes que provocan la adición o deleción de uno o más pares de bases en el ADN, lo que modifica el marco de lectura en el ARN.

▼B

1.3. CONSIDERACIONES INICIALES

En el ensayo de mutación inversa en bacterias se utilizan células procariotas, que difieren de las células de mamífero en aspectos como la absorción, el metabolismo, la estructura cromosómica y los procesos de reparación del ADN. En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exó-gena, si bien tales sistemas no pueden reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Por tanto, el ensayo no proporciona información directa sobre la potencia mutagénica y carcinogénica de una sustancia determinada en mamíferos.

El ensayo de mutación inversa en bacterias se emplea habitualmente para hacer una selección inicial de la actividad genotóxica y, en particular, de la actividad inductora de mutaciones puntuales. Una importante base de datos ha puesto de manifiesto que muchas sustancias químicas que dan un resultado positivo en este ensayo también presentan actividad mutagénica en otros ensayos. También hay agentes mutagénicos que no son detectados por este ensayo. Esas deficiencias pueden deberse a la naturaleza específica del efecto detectado, a diferencias de la activación metabólica o de la biodisponibilidad. Por otra parte, los factores que incrementan la sensibilidad del ensayo de mutación inversa en bacterias pueden llevar a sobrestimar la actividad mutagénica.

El ensayo de mutación inversa en bacterias puede no ser apropiado para evaluar determinadas clases de sustancias químicas como los compuestos muy bactericidas (por ejemplo, algunos antibióticos) y aquellos de los que se cree (o se sabe) que interfieren de forma específica en el sistema de replicación celular de los mamíferos (por ejemplo, algunos inhibidores de la topoisomerasa y algunos análogos de los nucleósidos). En esos casos están más indicados los ensayos de mutaciones en mamíferos.

Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo son carcinógenos para los mamíferos, la correlación no es absoluta, sino que depende de la clase química. Además de ello, hay carcinógenos que el ensayo no detecta, pues actúan por mecanismos que no son genotóxicos o que no existen en las células bacterianas.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen las suspensiones de células bacterianas a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica exógena. En el método de incorporación en placa, las suspensiones se mezclan con agar de recubrimiento y se vierten inmediatamente sobre una placa en medio mínimo. En el método de preincubación, la mezcla de tratamiento se incuba y luego se mezcla con agar de recubrimiento antes de verterla sobre una placa en medio mínimo. En ambos casos, tras dos o tres días de incubación, se cuentan las colonias revertientes y se compara su cantidad con la de colonias revertientes espontáneas en las placas de control con disolvente.

Entre los diversos procedimientos descritos para realizar el ensayo de mutación inversa en bacterias los métodos siguientes se utilizan comúnmente: incorporación en placa (1) (2) (3) (4), preincubación (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluctuación (9) (10) y suspensión (11). También se han descrito modificaciones para los ensayos con gases y vapores (12).

▼B

Los procedimientos descritos en el método corresponden principalmente a la incorporación en placa y a la preincubación. Ambos son aceptables para realizar experimentos con y sin activación metabólica. El método de preincubación resulta más eficaz para detectar determinadas sustancias que pertenecen a clases químicas que incluyen nitrosaminas alifáticas de cadena corta, metales divalentes, aldehídos, azocolorantes y diazocom-puestos, alcaloides de la pirolizidina, compuestos alílicos y nitrocompuestos (3). También se reconoce que algunas clases de mutágenos no siempre se detectan con procedimientos ordinarios como los métodos de incorporación sobre placa y de preincubación. Esos casos deben considerarse «especiales» y se recomienda seriamente utilizar otros procedimientos para detectarlos. Se han determinado los «casos especiales» siguientes (junto con ejemplos de procedimientos de detección eficaces): azocolorantes y diazocompuestos (3) (5) (6) (13), gases y sustancias químicas volátiles (12) (14) (15) (16) y glicósidos (17) (18). Cualquier desviación respecto al procedimiento ordinario ha de estar científicamente justificada.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Preparación**

1.5.1.1. *Bacterias*

Se dejan crecer cultivos bacterianos recientes hasta el final de la fase exponencial o hasta el principio de la fase estacionaria (unas 10^9 células por ml). No deben emplearse cultivos que se encuentren al final de la fase estacionaria. Es fundamental que los cultivos utilizados para el experimento contengan un título elevado de bacterias viables. El título puede demostrarse sobre la base de datos de controles anteriores sobre curvas de crecimiento o bien determinando en cada ensayo el número de células viables mediante un experimento de cultivo en placas.

La temperatura de incubación recomendada es de 37 ºC.

Se emplearán al menos cinco cepas bacterianas, de las cuales cuatro serán de *S. typhimurium* (TA1535; TA 1537, TA97a o TA97; TA98 y TA100), de fiabilidad demostrada y cuya respuesta sea reproducible entre laboratorios. Esas cuatro cepas de *S. typhimurium* poseen pares de bases GC en el sitio de reversión primaria y se sabe que no son capaces de detectar determinados mutágenos oxidantes, agentes de entrecruzamiento e hidracinas. Dichas sustancias son detectadas por las cepas *E. coli* WP2 y *S. typhimurium* TA102 (19), que poseen un par de bases AT en el sitio de reversión primaria. Así pues, se recomienda la combinación de cepas siguiente.

— *S. typhimurium* TA1535, y

— *S. typhimurium* TA1537 y TA97 o TA97a, y

— *S. typhimurium* TA98, y

— *S. typhimurium* TA100, y

— *E. coli* WP2 uvrA o *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) o *S. typhimurium* TA102.

Para detectar mutágenos de entrecruzamiento puede ser mejor incluir TA102 o añadir una cepa de *E. coli* eficaz en la reparación de ADN [por ejemplo, *E. coli* WP2 o *E. coli* WP2 (pKM101)].

▼B

Se seguirán procedimientos reconocidos de preparación de cultivos madre, comprobación de marcadores y conservación. Debe demostrarse en cada preparación de cultivo madre congelado que es necesario aportar el aminoácido en cuestión para que haya crecimiento (histidina en las cepas de *S. typhimurium* y triptófano en las de *E. coli*). Se controlarán de igual manera otras características fenotípicas, en concreto la presencia o ausencia de factores R, si procede [resistencia a la ampicilina en las cepas TA98, TA100 y TA97a o TA97, WP2 uvrA y WP2 uvrA (pKM101), y a la ampicilina + tetraciclina en la cepa TA102] y la presencia de mutaciones características (mutación rfa en *S. typhimurium* mediante la sensibilidad al violeta cristal, y mutación uvrA en *E. coli* o uvrB en *S. typhimurium,* mediante la sensibilidad a la luz ultravioleta) (2) (3). Las cepas deben producir un número de colonias revertientes espontáneas por placa en las gamas de frecuencia esperadas sobre la base de datos de controles anteriores del laboratorio y preferiblemente en la gama recogida en las publicaciones.

1.5.1.2. *Medio*

Se emplearán un agar mínimo adecuado (por ejemplo, con medio mínimo E de Vogel-Bonner y glucosa) y un agar de recubrimiento con histidina y biotina o triptófano para permitir pocas divisiones celulares (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activación metabólica*

Las bacterias deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (1) (2) o una mezcla de fenobarbital y β-naftoflavona (18) (20) (21). La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 5 al 30 % v/v en la mezcla S9. La elección y la condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase de sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial. En el caso de los azocolorantes y los diazocompuestos puede estar más indicado utilizar un sistema reductor de activación metabólica (6) (1 3).

1.5.1.4. *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las bacterias. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las bacterias y la actividad de la S9 (22). Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o un vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua.

▼B

1.5.2. **Condiciones de ensayo**

1.5.2.1. *Cepas de ensayo (véase el punto 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentraciones de exposición*

Para determinar la mayor concentración de la sustancia de ensayo deben considerarse, entre otros criterios, la citotoxicidad y la solubilidad en la mezcla de tratamiento final.

Puede ser útil determinar la toxicidad y la insolubilidad en un experimento preliminar. La citotoxicidad puede manifestarse por una reducción del número de colonias revertientes, la disminución o la aclaración de la confluencia del césped bacteriano, o la tasa de supervivencia de los cultivos tratados. La citotoxicidad de una sustancia puede verse alterada en presencia de sistemas de activación metabólica. Ha de valorarse la insolubilidad en forma de precipitación en la mezcla final en las condiciones reales de ensayo, visible por simple observación.

Si se trata de sustancias de ensayo solubles y no citotóxicas, la concentración máxima recomendada es de 5 mg/placa o 5 µl/placa. En el caso de sustancias no citotóxicas que no sean solubles a dicha concentración, una o varias de las concentraciones empleadas resultarán insolubles en la mezcla de tratamiento final. Las sustancias de ensayo que ya sean citotóxicas por debajo de 5 mg/placa o 5 µl/placa deberán ensayarse a concentraciones que llegarán como máximo hasta la concentración citotóxica. El precipitado no ha de interferir en la evaluación.

Se emplearán al menos cinco concentraciones analizables de la sustancia de ensayo con intervalos semilogarít-micos aproximadamente ($\sqrt{10}$) para el experimento inicial. Si se está estudiando la relación respuesta-concentración, puede estar indicado emplear intervalor menores. Para evaluar sustancias que contengan cantidades considerables de impurezas potencialmente mutagénicas podrá considerarse el uso de concentraciones superiores a 5 mg/placa o 5 µl/placa.

1.5.2.3. *Controles positivos y negativos*

En todos los experimentos deberán realizarse en paralelo controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) específicos de la cepa utilizada, con y sin activación metabólica. Se seleccionarán las concentraciones del control positivo que demuestren ser eficaces en cada experimento.

En los experimentos con sistema de activación metabólica, la sustancia o sustancias de referencia del control positivo se elegirán con arreglo al tipo de cepa bacteriana empleada.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias adecuadas para los controles positivos en ensayos con activación metabólica:

N° CAS	N° Einecs	Sustancia
781-43-1	212-308-4	9,10-Dimetilantraceno
57-97-6	200-359-5	7,12-Dimetilbenzo[a]aniraceno
50-32-8	200-028-5	Benzo[a]pireno
613-13-8	210-330-9	2-Aminoantraceno

▼B

N° CAS	N° Einecs	Sustancia
50-18-0		Ciclofosfamida
6055-19-2	200-015-4	Monohidrato de ciclofosfamida

La sustancia siguiente es apropiada para el control positivo del método de activación metabólica reductora:

Sustancia	N° CAS	N° Einecs
Rojo Congo	573-58-0	209-358-4

El 2-aminoantraceno no ha de emplearse como único indicador de la eficacia de la mezcla S9. Caso de emplearlo, todos los lotes de S9 han de caracterizarse asimismo con un mutágeno que requiera activación metabólica mediante enzimas microsomales, corno el benzo[a]pireno o el dimetilbenzoantraceno.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos específicas de determinadas cepas para ensayos sin sistema de activación metabólica exógena:

N° CAS	N° Einecs	Sustancia	Cepa
26628-22-8	247-852-1	Azida de sodio	TA 1535 yTA 100
607-57-8	210-138-5	2-Nitrofluoreno	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-Aminoacridina	TA 1537, TA 97 y TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 y TA 97a
80-15-9	201-254-7	Hidroperóxido de cumeno	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomicina C	WP2uvrA y TA 102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	WP2, WP2uvrA y WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-Nitroquinolina-l-óxido	WP2, WP2uvrA y WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		Furilfuramida (AF2)	Cepas que contengan plásmidos

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

Se realizarán controles negativos sin sustancia de ensayo, únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán de igual manera que los lotes tratados. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior sobre controles que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutá-genos.

▼B

1.5.3. **Procedimiento**

En el método de incorporación sobre placa (1) (2) (3) (4), sin activación metabólica, suele mezclarse 0,05 ml o 0,1 ml de las soluciones de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano fresco (aproximadamente 10^8 células viables) y 0,5 ml de solución tampón estéril con 2,0 ml de agar de recubrimiento. En el ensayo con activación metabólica suele añadirse 0,5 ml de mezcla de activación metabólica que contenga una cantidad adecuada de fracción postmitocondrial (del 5 al 30 % v/v en dicha mezcla) al agar de recubrimiento (2,0 ml), las bacterias y la sustancia o solución de ensayo. Se mezcla el contenido de cada tubo y se vierte sobre una placa de agar mínimo. Se deja solidificar el agar de recubrimiento antes de incubar.

En el método de preincubación (2) (3) (5) (6) se incuba la sustancia o solución de ensayo con la cepa experimental (aproximadamente 10^8 células viables) y la solución tampón de ensayo o el sistema de activación metabólica (0,5 ml), por lo general durante 20 minutos o más a 30-37 ºC. Después se añade el agar de recubrimiento y se vierte sobre una placa de agar mínimo. Habitualmente se mezcla 0,05 a 0,1 ml de sustancia o solución de ensayo, 0,1 ml de cultivo bacteriano y 0,5 ml de mezcla S9 o solución tampón estéril con 2,0 ml de agar de recubrimiento. Se airean los tubos durante la preincubación con un agitador.

Se prepararán tres placas por cada dosis para estimar adecuadamente la variación. Pueden prepararse solo dos placas por dosis si se justifica científicamente. La pérdida ocasional de una placa no invalida necesariamente el ensayo.

Las sustancias gaseosas o volátiles han de someterse a ensayo con métodos adecuados (recipientes de cultivo herméticos, etc.) (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubación**

Se incuban todas las placas de un mismo ensayo entre 48 y 72 horas a 37 ºC. Al término de la incubación, se cuenta el número de colonias revertientes por placa.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se facilitará el número de colonias revertientes por placa, así como el número de colonias revertientes en las placas del control negativo (control con disolvente y control sin tratar, en su caso) y del positivo. Debe proporcionarse el recuento por placa, la media de colonias revertientes por placa y la desviación estándar correspondientes a la sustancia de ensayo y a los controles positivos y negativos (sin tratar y/o con disolvente).

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. Los resultados negativos se confirmarán caso por caso. Los casos en que dicha confirmación no se considere necesaria deberán justificarse. En los experimentos ulteriores se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentra la separación entre concentraciones, el método de tratamiento (incorporación sobre placa o prcincubación líquida) y las condiciones de activación metabólica.

▼B

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración en la gama utilizada y/o aumento rcproducible con una o varias concentraciones en el número de colonias revertientes por placa al menos en una cepa, con o sin sistema de activación metabólica, etc.) (23). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (24). No obstante, el hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

No se considerarán mutágenas en el ensayo las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de mutación inversa en bacterias indica que la sustancia de ensayo induce mutaciones puntuales por sustitución de bases o desplazamientos del marco de lectura en el genoma de *Sal-monella typhimurium* y/o *Escherichia coli*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no resulta mutagénica en la especie estudiada.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del disolvente o vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Cepas:

— cepas utilizadas,

— número de células por cultivo,

— características de las cepas.

Condiciones del ensayo:

— cantidad de sustancia de ensayo por placa (mg/placa o μl/placa), fundamento de la selección de las dosis y número de placas por concentración,

— medios utilizados,

— tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,

— procedimientos de tratamiento.

Resultados:

— signos de toxicidad,

— signos de precipitación,

— recuentos por placa,

▼B

— cantidad media de colonias revertientes por placa y desviación estándar,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos, si se han realizado,

— datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.,* 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V., F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters, 1,* pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Pan* 1 *Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety,* S, pp, 167-177.

(9) Green, M. H. L, Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res., 38,* pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis, 3,* pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res., 307,* pp. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D, and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation* Res., *136,* pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mulagen., 19,* pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis, 9,* pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugales in *Salomonella typhimurium, Cancer Res.,* 39, pp, 3780-3782,

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77,* pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with E*scherichia coli* WP2 Tester strains, *Mulagenesis,* 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* eds, F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G, G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mulalion Res., 88,* pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res., 189,* pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mulagenicity Testing, Part II. Slatistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B

B.15 **ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS Y DETECCIÓN DE CARCINOGÉNESIS — MUTACIÓN GÉNICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Diversas cepas haploides y diploides de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden utilizarse para determinar la producción de mutaciones génicas por agentes químicos con y sin activación metabólica.

Es posible determinar la mutación directa en cepas haploides, en especial mediante la apreciación de la conversión de mutantes rojos consumidores de adenina (ade-1, ade-2) en una forma blanca que la precisa en cantidad doble, así como por sistemas selectivos, como la inducción de resistencia a la canavanina y la cicloheximida.

El método de mutación inversa, el más utilizado, comprende la utilización de la cepa haploide XV 185-14C, portadora de las mutaciones sin sentido ocres ade2-l, arg4-17, lys 1-1 y trp 5-48, reversibles mediante mutágenos causantes de sustituciones de bases que induzcan mutaciones en un punto específico o mutaciones supresoras ocres. La cepa XV 185-14C también lleva el marcador his 1-7, una mutación sin sentido invertida principalmente por mutaciones de segundo punto, y el marcador hom 3-10, invertido por mutágenos que desplazan el marco de lectura del código genético *(frameshift mutagens)*.

De las cepas diploides de *S. cerevisiae,* la única que se utiliza ampliamente es D_7, homocigota para ilv 1-92.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Se prepararán soluciones de las sustancias químicas estudiadas y las de control inmediatamente antes de la prueba con ayuda de un vehículo apropiado. Cuando se trate de compuestos orgánicos no hidrosolubles, los disolventes orgánicos, como etanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), deberán emplearse en una concentración no superior al 2 % v/v. La concentración final del vehículo no debe influir de modo notable en la viabilidad de las células y en las características de crecimiento.

▼B

Activación metabólica

Las células han de exponerse a las sustancias analizadas en presencia de un sistema de activación metabólica exógena apropiado.

El método de uso más frecuente consiste en añadir la fracción posmitocondrial preparada a partir de hígados de roedores tratados previamente con inductores enzimáticos, a la que se añaden cofactores. También puede considerarse oportuno para la activación metabólica el empleo de especies, tejidos, fracciones posmitocondriales o métodos distintos.

Condiciones del ensayo

Cepas experimentales

La cepa haploide XV 185-14C y la cepa diploide D_7 son las más utilizadas en estudios de mutación génica, pero también pueden ser apropiadas otras cepas.

Medios

Se utilizan medios de cultivo apropiados para la determinación del número de supervivientes y mutantes.

Uso de testigos negativos y positivos

Se utilizarán testigos positivos no tratados y tratados con disolventes de modo simultáneo. Es preciso utilizar sustancias químicas de control positivas para cada finalidad de mutación específica.

Concentración de exposición

Se utilizarán, al menos, cinco concentraciones debidamente escalonadas de la sustancia estudiada. En caso de sustancias tóxicas, la concentración máxima probada no reducirá el índice de supervivencias a menos del 5-10 %. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Condiciones de incubación

Las placas se incuban en la oscuridad, a 28-30 ºC, durante 4-7 días.

Frecuencia de mutación espontánea

Se utilizarán subcultivos cuyas frecuencias de mutaciones espontáneas estén dentro de los límites normales admitidos.

▼B

Número de repeticiones

Se utilizarán al menos tres placas por concentración, a fin de determinar los prototrofos producidos por mutación génica, y para observar la viabilidad de las células. Si en los experimentos se emplearan marcadores, como hom 3-10, con tasa de mutaciones baja, puede aumentarse el número de placas utilizadas para lograr datos estadísticamente pertinentes.

Procedimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* suelen tratarse en el curso de una prueba en medio líquido en la que se utilizan células en fase estacionaria o de crecimiento. Las experiencias iniciales deberán realizarse sobre células en crecimiento. Se expone a 1-5 × 10^7 células/ml a la sustancia objeto de estudio durante un período de hasta 18 horas a 28-37 ºC, con agitación de la mezcla; durante el tratamiento, se añade una cantidad adecuada de un sistema de activación metabólica. Si la primera experiencia da resultados negativos, se procederá a una segunda, en esta ocasión con células en fase estacionaria; si los resultados de la primera fueran positivos, se confirmarán en una experiencia independiente. Al final del tratamiento, las células se centrifugan, lavan y siembran en un medio de cultivo apropiado. Tras la incubación, se examinan las placas para determinar la supervivencia y la inducción de mutaciones génicas.

2. RESULTADOS

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de colonias contadas, el de mutantes, el índice de supervivencia y la frecuencia de mutantes. Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente. Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. INFORME

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— cepa utilizada,

— condiciones del ensayo: células en fase estacionaria o de crecimiento, composición de los medios, temperatura y duración de la incubación, sistema de activación metabólica,

— condiciones de tratamiento: niveles de exposición, procedimiento y duración del tratamiento, temperatura del tratamiento, controles positivos y negativos,

— número de colonias contadas, número de mutantes, supervivencia y frecuencia de mutantes, relación dosis-respuesta si es posible, evaluación estadística de los datos,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. REFERENCIAS

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.16. **RECOMBINACIÓN MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

En *Saccharomyces cerevisiae,* es posible apreciar la recombinación mitótica entre los genes (o, más generalmente, entre un gen y su centrómero) y en el interior de ellos. En el primer caso, se habla de *crossing-over,* generador de intercambios recíprocos, en tanto que, en el segundo los intercambios, casi nunca son recíprocos, y se habla de conversión génica. El *crossing-over* se determina generalmente por la producción de colonias o sectores recesivos homocigotos a partir de una cepa heterocigota, mientras que la conversión génica lo es mediante la producción de inversores prototróficos en una cepa auxotrofa heteroalélica portadora de dos alelos defectuosos distintos del mismo gen. Las cepas de uso más frecuente para descubrir una conversión génica mitótica son D_4 (heteroalélica para ade 2 y trp 5), D_7 (heteroalélica para trp 5), BZ_{34} (heteroalélica para arg 4) y JD1 (heteroalélica para his 4 y trp 5). El *crossing-over* mitótico productor de sectores homocigotos de color rojo y rosa se determina en D_5 o en D_7 (que también sirve para analizar la conversión génica mitótica y la mutación inversa para ilv 1-92), cepas ambas heteroalélicas complementarias de los alelos ade 2.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Se preparan soluciones de las sustancias químicas estudiadas, y de los compuestos de control y de referencia, inmediatemente antes del ensayo, con ayuda de un vehículo apropiado. Cuando se trate de compuestos orgánicos no hidrosolubles, los disolventes orgánicos como etanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), deberán emplearse en una concentración no superior al 2 % v/v. La concentración final del vehículo no debe influir de modo notable en la viabilidad de las células ni en las características de crecimiento.

Activación metabólica

Las células han de exponerse a las sustancias analizadas en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena apropiado. El método de uso más frecuente consiste en añadir a la fracción posmitocondrial preparada a partir de hígados de roedores tratados previamente con inductores enzimáticos, a la que se añaden cofactores. También puede considerarse oportuno para la activación metabólica el empleo de especies, tejidos, fracciones posmitocondriales o métodos distintos.

▼B

Condiciones del ensay

Cepas experimentales

Las cepas que se utilizan con más frecuencia son las diploides D_4, D_5, D_7 y JD1, pero también pueden considerarse apropiadas otras.

Medios

Se utilizan medios de cultivo apropiados para la determinación de la supervivencia y de la frecuencia de recombinación mitótica.

Uso de testigos negativos y positivos

Se utilizarán testigos positivos no tratados y tratados con disolvente de modo simultáneo. Es preciso utilizar sustancias químicas de control positivas apropiadas para cada finalidad de recombinación específica.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán, al menos, cinco concentraciones debidamente escalonadas de la sustancia estudiada. Entre los factores que deben tenerse en cuenta figuran la citotoxicidad y la solubilidad. La concentración mínima no debe influir en modo alguno en la viabilidad celular. En casos de sustancias tóxicas, la concentración máxima probada no reducirá el índice de supervivencia a menos del 5-10 %. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta su límite de solubilidad mediante métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Las células pueden exponerse a las sustancias estudiadas en la fase estacionaria o durante el crecimiento hasta completar períodos de 18 horas, como máximo. No obstante, si se utilizan períodos de tratamiento largos, hay que examinar al microscopio los cultivos por si aparecieran esporas, ya que su presencia invalidaría la prueba.

Condiciones de incubación

Las placas se incuban en la oscuridad, a 28-30 ºC, durante cuatro o siete días. Las placas que se utilicen para la determinación de los sectores homocigotos rojo y rosa producidos por *crossing-over* mitótico se conservarán en frigorífico a ± 4 ºC durante uno o dos días más antes de la evaluación, a fin de que pueda intensificarse la pigmentación de las colonias de interés.

Frecuencia de recombinaciones mitóticas espontáneas

Se utilizarán subcultivos cuyas frecuencias de recombinaciones mitóticas espontáneas estén dentro de los límites normales admitidos.

▼B

Número de repeticiones

Se sembrarán al menos tres placas por concentración para determinar tanto la viabilidad como el número de prototrofos producidos por conversión génica mitótica. En caso de determinación de homocigosis recesiva producida por *crossing-over* mitótico, se aumentará el número de placas para obtener un número adecuado de colonias.

Procedimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* suelen tratarse en el curso de una prueba en medio líquido en la que se utilizan células en fase estacionaria o de crecimiento. Las experiencias iniciales deberán realizarse sobre células en crecimiento. Se expone 1-5 × 10^7 células/ml a la sustancia objeto de estudio durante un período de hasta 18 horas a 28-37 ºC, con agitación de la mezcla; durante el tratamiento, se añade, si procede, una cantidad adecuada de un sistema de activación metabólica.

Al final del tratamiento, las células se centrifugan, lavan y siembran en un medio de cultivo apropiado. Tras la incubación se examinan las placas para determinar la supervivencia y la inducción de recombinación mitótica.

Si la primera experiencia da resultados negativos, se procederá a una segunda, en esta ocasión con células en fase estacionaria; si los resultados de la primera fueran positivos, se confirmarán en una experiencia independiente.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de colonias contadas, el de recombinantes, el índice de supervivencia y la frecuencia de recombinantes.

Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— cepa utilizada,

— condiciones del ensayo: células en fase estacionaria o de crecimiento, composición de los medios, temperatura y duración de la incubación, sistema de activación metabólica,

— condiciones del tratamiento: niveles de exposición, procedimiento y duración del tratamiento, temperatura del tratamiento; controles positivos y negativos,

— número de colonias contadas, número de recombinantes, supervivencia y frecuencia de recombinación, relación dosis-respuesta si es posible, evaluación estadística de los datos,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

▼B

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.17. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 476 sobre el ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* puede realizarse para detectar mutaciones géni-cas inducidas por sustancias químicas. Entre las líneas celulares adecuadas para el ensayo se encuentran las células de linfoma de ratón L5178Y, las líneas celulares CHO, CHO-AS52 y V79 del hámster chino y las células linfoblastoides humanas TK6 (1). En dichas líneas celulares, los parámetros genéticos más empleados revelan una mutación en los loci de la timidinquinasa (TK) y la hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), y en un transgen de la xantina guanina fosforibosiltransferasa (XPRT). Los ensayos de mutación TK, HPRT y XPRT detectan diversos espectros de fenómenos genéticos. La localización autosómica de TK y XPRT permite poner de manifiesto fenómenos genéticos (por ejemplo, deleciones importantes) que no se detectan en el locus HPRT de los cromosomas X (2) (3) (4) (5) (6).

En este ensayo pueden emplearse cultivos de líneas celulares establecidas o estirpes celulares. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo y la estabilidad de la frecuencia de mutaciones espontáneas.

En los ensayos *in vitro* suele ser necesario emplear un sistema de activación metabólica exógena, si bien este no puede reproducir todas las condiciones que se dan *in vivo* en los mamíferos. Deben evitarse las circunstancias que puedan conducir a resultados que no reflejen la mutagenicidad intrínseca. Los resultados positivos que no reflejan la mutagenicidad intrínseca pueden deberse a cambios en el pH, la osmolalidad o altos grados de citotoxicidad (7).

El ensayo se emplea para detectar las posibles sustancias mutágenas o carcinógenas para los mamíferos. Pese a que muchos de los compuestos que dan un resultado positivo en este ensayo con carcinógenos para los mamíferos, no hay una correlación absoluta entre los resultados del mismo y la carcinogenicidad. La correlación depende de la clase química. Además de ello, cada vez hay más pruebas de que existen carcinógenos que el ensayo no detecta, pues, al parecer, estos actúan por mecanismos no genotóxicos o mecanismos ausentes en las células bacterianas (6).

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Mutación directa: mutación génica del tipo parental a la condición mutante, que da lugar a una alteración o pérdida de la actividad enzimática o la función de la proteína codificada.

Mutágenos que provocan la sustitución de un par de bases: sustancias que provocan la sustitución de uno o varios pares de bases en el ADN.

Mutágenos que desplazan el marco de lectura: sustancias que provocan la adición o deleción de uno o más pares de bases en la molécula de ADN.

▼B

Período de expresión fenotípica: tiempo que tardan en desaparecer los productos génicos inalterados de las células mutadas recientemente.

Frecuencia de mutantes: número de células mutantes dividido por el número de células viables.

Crecimiento total relativo: aumento del número de células en el tiempo respecto a una población celular de control; es el producto del crecimiento en suspensión respecto al control negativo por la eficacia de clonado respecto al control negativo.

Crecimiento en suspensión relativo: aumento del número de células durante el período de expresión respecto al control negativo.

Viabilidad: eficacia de clonado de las células tratadas en el momento de la siembra en condiciones selectivas tras el período de expresión.

Supervivencia: eficacia de clonado de las células tratadas cuando se siembran al final del período de tratamiento; suele expresarse respecto a la supervivencia de la población celular de control.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las células deficientes en timidinquinasa (TK) a causa de la mutación $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ son resistentes a los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT), análogo de la pirimidina. Las células capaces de producir timidinquinasa son sensibles a la TFT, que inhibe el metabolismo y detiene la división celular. Así pues, las células imitantes son capaces de proliferar en presencia de TFT, mientras que las células normales, que contienen timidinquinasa, no lo son. Del mismo modo, las células deficientes en HPRT o XPRT se seleccionan por su resistencia a la 6-tioguanina (TG) o la 8-azaguanina (AG). Si en los ensayos de mutación génica en células de mamífero se utiliza una sustancia de ensayo análoga a una base o un compuesto afín al agente selectivo, deben considerarse detenidamente sus propiedades, por ejemplo, cuando se sospeche que la sustancia de ensayo presenta toxicidad selectiva en las células mutantes y no mutantes. Así pues, habrá que confirmar la eficacia del sistema o agente de selección cuando se estudien sustancias de estructura afín a la del agente selectivo (8).

Se exponen las células en suspensión o el cultivo en monocapa a la sustancia de ensayo, con y sin activación metabólica, durante un período apropiado. Se realiza un subcultivo para determinar la citotoxicidad y dejar que se exprese el fenotipo antes de la selección de los mutantes (9) (10) (11) (12) (13). La citotoxicidad suele determinarse midiendo la eficacia relativa de clonado (supervivencia) o el crecimiento total relativo de los cultivos tras el período de tratamiento. Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un período de tiempo suficiente y específico para cada locus y tipo celular seleccionado, de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima. La frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con agente selectivo y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficacia de clonado (viabilidad). Tras un período de incubación adecuado, se cuentan las colonias. Se compara el número de colonias mutantes en el medio selectivo y en el no selectivo para hallar la frecuencia de mutantes.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Células*

Entre los diversos tipos de células apropiados para este ensayo se encuentran las de los subclones de L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 y TK6. Deben emplearse tipos de células que presenten una sensibilidad probada a los mutágenos químicos, una elevada eficacia de clonado y una frecuencia estable de mutaciones espontáneas. Se comprobará la ausencia de contaminación por micoplasma. Se desecharán las células contaminadas.

El ensayo debe estar diseñado de manera que su sensibilidad y potencia estén predeterminadas. El número de células, cultivos y concentraciones de la sustancia de ensayo ha de reflejar dichos parámetros previamente definidos (14). En cada fase del ensayo, el número mínimo de células viables que sobrevivan al tratamiento deberá estar basado en la frecuencia de mutación espontánea. Por lo general, se emplea una cantidad de células al menos igual a diez veces el inverso de dicha frecuencia. Se recomienda, no obstante, utilizar un mínimo de 10^6 células. Para cerciorarse de que el ensayo proporciona resultados coherentes deberá disponerse de datos de controles históricos adecuados sobre el sistema celular utilizado.

1.4.1.2. *Medios y condiciones de cultivo*

Deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados (recipientes de cultivo, temperatura, concentración de CO_2 y humedad). Los medios han de elegirse con arreglo a los sistemas selectivos y los tipos celulares empleados en el ensayo. Es especialmente importante aplicar condiciones de cultivo que favorezcan un crecimiento celular óptimo durante el período de expresión y la capacidad de las células, mutantes y no mutantes, de formar colonias.

1.4.1.3. *Preparación de los cultivos*

Se multiplican células de cultivos madre, se siembran en el medio de cultivo y se incuban a 37 ºC. Antes de usar los cultivos en el ensayo, puede ser necesario lavarlos de las células mutantes que contengan.

1.4.1.4. *Activación metabólica*

Las células deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (15) (16) (17) (19) o una mezcla de fenobarbital y β-naftoflavona (19) (20).

La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 1 al 10 % v/v en el medio de ensayo final. La elección y condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase química de la sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial.

▼B

Son varias las técnicas —como la producción mediante ingeniería genética de líneas celulares que expresen enzimas activadoras específicas— que pueden proporcionar el potencial de activación endógena. La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente (por ejemplo, por la importancia de la isoenzima del citocromo P450 para el metabolismo de la sustancia de ensayo, etc.).

1.4.1.5. *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias de ensayo líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo y/o diluirse antes del tratamiento. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo y es compatible con la supervivencia de las células y la actividad de S9. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale dicha compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cuando se estudien sustancias inestables en presencia de agua, deberán emplearse disolventes orgánicos que no contengan agua. Esta podrá eliminarse añadiendo un tamiz molecular.

1.4.2.2. *Concentraciones de exposición*

Para determinar la concentración máxima de exposición deben considerarse al menos los siguientes criterios: citotoxicidad, solubilidad en el sistema de ensayo y variaciones del pH o la osmolalidad.

La citotoxicidad se determinará con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la integridad y el crecimiento celular, como la eficacia de clonado relativa (supervivencia) o el crecimiento total relativo. Puede ser útil determinar la citotoxicidad y la solubilidad en un experimento preliminar.

Se emplearán al menos cuatro concentraciones analizables. Si se produce citotoxicidad, la gama de concentraciones deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula, lo cual suele significar que la separación entre concentraciones corresponde a un factor comprendido entre 1 y $\sqrt{10}$. En el caso de sustancias escasamente citotóxicas, la concentración máxima de ensayo será la menor de estas tres: 5 mg/ml, 5 µl/ml o 0,01 M.

▼B

Las sutancias escasamente solubles deben ensayarse hasta concentraciones iguales o superiores al límite de solubilidad en las condiciones de cultivo. Ha de ponerse de manifiesto la insolubilidad en el medio de tratamiento final al que se exponen las células. Puede ser útil determinar la solubilidad al principio y al final de tratamiento, pues esta puede variar durante la exposición en el sistema de ensayo debido a la presencia de células, S9, suero, etc. La insolubilidad puede detectarse por simple observación. El precipitado no debe interferir en la evaluación del resultado.

1.4.2.3. *Controles*

En todos los experimentos deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo, con y sin activación metabólica. Cuando se aplique esta, la sustancia del control positivo ha de requerir activación para provocar una respuesta mutagénica.

A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para el control positivo:

Activación metabólica	Locus	Sustancia	N° CAS	N° EINECS
Ausencia de activación metabólica exógena	HPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (colonias grandes y pequeñas)	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Presencia de activación metabólica exógena	HPRT	3-metilcolantreno	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetilbenzoantraceno	57-97-6	200-359-5
	TK (colonias grandes y pequeñas)	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
		Monohidrato de ciclofosfamida	6055-19-2	
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
		3-Metilcolantreno	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrosodimetilamina (para grandes cantidades de S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5

Pueden utilizarse otras sustancias de referencia adecuadas para el control positivo, por ejemplo, la 5-bromo 2'-desoxiuridina (n° CAS 59-14-3, n° EINECS 200-415-9), si el laboratorio dispone de una base de datos al respecto. Deberá considerarse la utilización en dicho control de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

▼B

Se realizarán controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo en el medio de tratamiento, y se tratarán de igual manera que los lotes tratados. Se prepararán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información de controles históricos que demuestre que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

1.4.3. **Procedimiento**

1.4.3.1. *Tratamiento con la sustancia de ensayo*

Las células en crecimiento se tratan con la sustancia de ensayo, en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La duración de la exposición ha de ser suficiente (de 3 a 6 horas suelen bastar) y puede ampliarse hasta uno o varios ciclos celulares.

Pueden realizarse uno o dos cultivos con cada concentración de la sustancia de ensayo. En el caso de realizarse uno solo, se aumentará el número de concentraciones con el fin de disponer de suficientes cultivos para el análisis (por ejemplo, un mínimo de ocho concentraciones analizables). Deben realizarse dos cultivos para el control negativo (disolvente).

Las sustancias gaseosas o volátiles han de evaluarse con métodos adecuados, tales como recipientes de cultivo herméticos, etc. (21) (22).

1.4.3.2. *Determinación de la supervivencia, la viabilidad y la frecuencia de mutantes*

Al término del período de exposición se lavan las células y se cultivan para determinar la supervivencia y dejar que se exprese el fenotipo mutante. La evaluación de la citotoxicidad suele empezarse después del período de tratamiento, determinando la eficacia de clonado relativa (supervivencia) o el crecimiento total relativo de los cultivos.

Cada locus necesita un tiempo mínimo determinado para que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas recientemente sea casi óptima (un mínimo de seis a ocho días en el caso de HPRT y XPRT y de dos días en el de TK). Las células se cultivan con y sin agente o agentes selectivos para determinar el número de mutantes y la eficacia de clonado, respectivamente. La viabilidad, que sirve para calcular la frecuencia de mutantes, empieza a determinarse al final del período de expresión colocando los cultivos en un medio no selectivo.

Si la sustancia de ensayo da un resultado positivo en el ensayo con L5178Y $TK^{+/-}$, deben medirse las colonias al menos en uno de los cultivos de ensayo (el de la concentración que dé resultados más positivos) y en los controles positivos y negativos. Si la sustancia de ensayo da un resultado negativo en el ensayo con L5178Y $TK^{+/-}$, deben medirse las colonias en los controles positivos y negativos. También pueden medirse las colonias en los estudios realizados con $TK6TK^{+/-}$.

▼B

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos deben incluir la determinación de la citotoxicidad y la viabilidad, los recuentos de colonias y la frecuencia de mutantes en los cultivos tratados y en los controles. Si el resultado del ensayo con L5178Y $TK^{+/-}$es positivo, las colonias se cuentan distinguiendo las grandes de las pequeñas al menos en un cultivo tratado (con la concentración de sustancia de ensayo que dé los resultados más positivos) y en los controles positivos y negativos. Debe estudiarse detenidamente la naturaleza molecular y citogenética tanto de las colonias grandes como de las pequeñas (23) (24). En el ensayo $TK^{+/-}$, las colonias se cuentan distinguiendo las de crecimiento normal (grandes) de las de crecimiento lento (pequeñas) (25). Las células mutantes que han sufrido las lesiones genéticas más importantes requieren un tiempo de duplicación mayor, de manera que forman colonias pequeñas. Dichas lesiones suelen variar desde la pérdida de un gen entero hasta las aberraciones cromo-sómicas visibles en el cariotipo. La inducción de pequeñas colonias mutantes se ha asociado a sustancias que provocan aberraciones cromosómicas importantes (26). Las células mutantes menos afectadas crecen a una velocidad similar a la de las células parentales y forman colonias grandes.

Debe proporcionarse el índice de supervivencia (eficacia de clonado relativa) o el crecimiento total relativo. La frecuencia de mutantes se expresa como el número de células mutantes respecto al número de células supervivientes.

Se proporcionarán los datos relativos a cada cultivo y se resumirán en forma de tabla.

No será preciso comprobar los resultados positivos claros, si bien los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales. Es preciso confirmar los resultados negativos caso por caso. Los casos en que dicha confirmación no se considere necesaria deberán justificarse debidamente. En los experimentos complementarios de aquellos que hayan dado resultados dudosos o negativos, se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio para ampliar la gama de condiciones analizadas. Entre los parámetros modificables se encuentran la separación entre concentraciones y las condiciones de activación metabólica.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento relacionado con la concentración o aumento reproducible de la frecuencia de mutantes, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia bilógica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

No se considerarán mutágenas en el sistema en cuestión las sutancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

▼B

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados eran claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* indica que la sustancia de ensayo provoca mutaciones génicas en los cultivos de células de mamífero utilizadas. El elemento más significativo es la relación dosis-respuesta positiva y reproducible. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca mutaciones génicas en los cultivos de células de mamífero utilizadas.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo o disolvente,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Células:

— tipo y procedencia,

— número de cultivos celulares,

— número de pases celulares, si procede,

— métodos de mantenimiento del cultivo celular, si procede,

— ausencia de micoplasma.

Condiciones del ensayo:

— fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos (datos relativos a la citotoxicidad, límites de solubilidad, si se conocen, etc.),

— composición del medio y concentración de CO_2,

— concentración de la sustancia de ensayo,

— volumen de vehículo y de sustancia de ensayo añadida,

— temperatura de incubación,

— tiempo de incubación,

— duración del tratamiento,

— densidad celular durante el tratamiento,

— tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,

— controles positivos y negativos,

▼B

— duración del período de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede),

— agentes selectivos,

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o ambiguos,

— métodos empleados para contar las células viables y las mutantes,

— definición del tamaño *y* el tipo de las colonias consideradas (incluidos, en su caso, los criterios de distinción de colonias «grandes» y «pequeñas»).

Resultados:

— signos de toxicidad,

— signos de precipitación,

— datos sobre el pH y la osmolalidad durante la exposición a la sustancia de ensayo, si se han determinado,

— tamaño de las colonias contadas, al menos en los controles positivos y negativos,

— capacidad del laboratorio para detectar mutantes en colonias pequeñas con el sistema L5178Y $TK^{+/-}$, en su caso,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos, si se han realizado,

— datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo,

— datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— frecuencia de mutantes.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mam-malian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E, H. Y. and Mailing, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mulation Res., 94,* pp. 467-485.

(4) Moore, M. M., Haringtón-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quanti-tation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loct, *Mulagenesis, 4,* pp. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res., 223,* pp. 121-128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation *Res.,* 312, pp. 235-239.

(7) Scott. D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res., 257,* pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 115, pp. 225-251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation *Res., 196,* pp. 17-36.

(10) Li, A, P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. R, Riddle, J. C, Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res., 189,* pp. 135-141.

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res., 216,* pp. 9-17.

(12) Stankowski. L. F. Jr., Tindall. K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-lnduced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.,* 160, pp. 133.147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al. (eds.) *Handbook of Mutagenichy Test Procedures,* Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Creen, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data.* Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, C, Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res., 46,* pp. 365-373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. R S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res., 59,* pp. 61-108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res., 113,* pp. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-lnduced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in In Vitro *Melabolic Activation in Mutagenesis Testing,* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L, Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agenta,* New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, Proc. Natl. *Acad. Sci, USA, 87,* pp. 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. L., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT) and Mutants of L51 78Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res., 229,* pp. 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.

▼B

B.18. **LESIÓN Y REPARACIÓN DE DNA — SÍNTESIS DE DNA NO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO***

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de síntesis no programada de DNA (UDS) mide la síntesis de reparación del DNA tras escisión y eliminación de un fragmento de DNA que contiene la región lesionada por agentes químicos y físicos. Se basa en la incorporación de timidina tritiada (^{3}H-TdR) al DNA de células de mamífero que no se encuentren en la fase S del ciclo celular. Es posible determinar la captación de ^{3}H-TdR mediante el examen del DNA procedente de células tratadas por autorradiografía o recuento en centelleo líquido (LSC): Las células de mamífero en cultivo, salvo si se utilizan hepatocitos primarios de rata, se tratan con la sustancia objeto de estudio con un sistema de activación metabólica exógeno y sin él. También es posible determinar la UDS por métodos *in vivo*.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Las sustancias químicas analizadas y las de control o referencia se prepararán en un medio de crecimiento, o se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados, para diluirse luego aún más en un medio de cultivo antes de utilizarse en el ensayo. La concentración final del vehículo no debe influir en la viabilidad celular.

Pueden utilizarse para este ensayo cultivos primarios de hepatocitos de rata, linfocitos humanos o líneas celulares establecidas (por ejemplo, fibroblastos humanos diploides).

Las células se expondrán a la sustancia química estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado.

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

Son necesarios, para cada punto experimental, al menos dos cultivos celulares para la autorradiografía y seis (o menos, si está justificado científicamente) para el recuento en centelleo líquido.

▼B

Uso de testigos negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento controles positivos y negativos (no tratados, con vehículo o ambos) simultáneos, con activación metabólica y sin ella.

Son ejemplos de controles positivos para la prueba con hepatocitos de ratas el 7,12-dimetilbenzantraceno (7,12-DMBA) o el 2-acetilaminfluoreno (2-AAF). En el caso de líneas celulares establecidas, el 4-NQO (4-nitriquinolina-N-óxido) es un ejemplo de control positivo para los ensayos por autorradiografía y LSC realizados sin activación metabólica; cuando se emplean sistemas de activación metabólica, un ejemplo de compuesto de control positivo sería la N-dimetilnitrosamina.

Concentraciones de exposición

Se utilizará una gama de concentraciones de la sustancia estudiada que permita determinar la respuesta de modo óptimo. La concentración máxima debe producir ciertos efectos citotóxicos. Los compuestos relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Células

Para mantener los cultivos, se utilizarán medios de crecimiento, concentraciones de CO_2 y temperatura y humedad apropiados. Las líneas celulares establecidas se examinarán periódicamente para comprobar si existe contaminación por mycoptasma.

Activación metabólica

En los cultivos primarios de hepatocitos no se utiliza ningún sistema de activación metabólica. Por su parte, las líneas celulares establecidas y los linfocitos se exponen a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado.

Procedimiento

Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas, derivadas de cultivos madre (por ejemplo, por tripainización o agitación) se siembran con la densidad adecuada en recipientes de cultivo y se incuban a 37 ºC.

Se establecen cultivos a corto plazo de hepatocitos de rata permitiendo a hepatocitos recién disociados en un medio apropiado fijarse a la superficie de crecimiento.

Los cultivos de linfocitos humanos se establecen por medio de técnicas apropiadas.

▼B

Tratamiento de los cultivos con la sustancia estudiada

Hepatocitos primarios de rata

Los hepatocitos de ratas recién aisladas se tratan con la sustancia estudiada, en un medio que contenga ^{3}H-TdR, durante un período de tiempo apropiado. Al final de este, se eliminará el medio, y se aclararán, fijarán y secarán las células. Las preparaciones se sumergen en una emulsión autorradiográfica (también cabe utilizar película fotográfica), se exponen, se revelan, se tiñen y se cuentan.

Líneas celulares establecidas y linfocitos

Técnicas autorradiográficas: Los cultivos celulares se exponen a la sustancia estudiada durante períodos de tiempo adecuados, y se tratan después con ^{3}H-TdR. El plazo de exposición dependerá de la naturaleza de la sustancia, de la actividad del sistema metabólico y del tipo de células. Para apreciar el pico de UDS, se añadirá ^{3}H-TdR al mismo tiempo que la sustancia analizada o en los pocos minutos posteriores a su exposición. La elección de una u otra de estas técnicas vendrá determinada por posibles interacciones entre la sustancia y la ^{3}H-TdR. Para distinguir esta última se utiliza, por ejemplo, un medio deficitario en arginina, un contenido de suero bajo o la adición de hidroxiurea al medio de cultivo.

Determinaciones de la UDS por LSC: Antes de proceder al tratamiento con la sustancia objeto de estudio, se bloqueará la entrada de las células en la fase S del modo antes indicado; a continuación, se expone a las células a la sustancia tal como se describe para la autorradiografía. Al final del período de incubación, se extrae el DNA de las células y se determinan el contenido total de DNA y el grado de incorporación de ^{3}H-TdR.

Hay que señalar que cuando se utilicen linfocitos humanos en las técnicas expuestas no es necesario suprimir la replicación semiconservadora de DNA en cultivos no estimulados.

Análisis

Determinaciones autorradiográficas

Para determinar la UDS en células en cultivo, no se cuentan los núcleos en fase S. Se contarán por lo menos 50 células por concentración. Las preparaciones recibirán un código antes del recuento. Se contarán en cada una de ellas varios campos, elegidos al azar y lo bastante alejados entre sí. Se determinará la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada al citoplasma mediante el recuento de tres superficies del tamaño del núcleo en el citoplasma de cada célula contada.

Determinación por LSC

En las determinaciones de la UDS por LSC debe utilizarse un número adecuado de cultivos para cada concentración y en los controles.

▼B

Todos los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

2.1. DETERMINACIONES AUTORRADIOGRÁFICAS

Se registrarán por separado la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada al citoplasma y el número de granos encontrados sobre el núcleo celular.

Pueden utilizarse la media, la mediana y el modo para describir la distribución de la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada en el citoplasma, así como el número de granos por núcleo.

2.2. DETERMINACIONES POR LSC

Para las determinaciones por LSC, se indicará la incorporación de ^{3}H-TdR en forma de dpm/μg de DNA. Puede utilizarse la media de dmp/μg de DNA, con su desviación estándar, para describir la distribución de la incorporación.

Los datos se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. DATOS EL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— células utilizadas, densidad y número de pases en el momento del tratamiento, número de cultivos celulares,

— métodos utilizados para el mantenimiento de los cultivos celulares, incluidos medio, temperatura y concentración de CO_2,

— sustancia estudiada, vehículo, concentraciones y justificación de la elección de las concentraciones empleadas en el ensayo,

— detalles sobre los sistemas de activación metabólica,

— programa de tratamiento,

— controles positivos y negativos,

— técnica autorradiográfica utilizada,

— métodos empleados para bloquear la entrada de las células en la fase S,

— técnicas utilizadas para extraer el DNA y determinar la cantidad total de DNA en la determinación por LSC,

— relación dosis-respuesta, si es posible,

— evaluación estadística,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

▼B

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.19. ENSAYO *IN VITRO* DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de intercambio de cromátidas hermanas (SCE) es una prueba a corto plazo encaminada a descubrir intercambios recíprocos de DNA entre 2 cromátidas hermanas de un cromosoma de desdoblamiento. Los SCE representan el intercambio recíproco de productos de replicación del DNA en loci aparentemente homólogos. Es probable que el proceso de intercambio comprenda la rotura y la reunión del DNA, aunque se sabe poco sobre su base molecular. Para descubrir los SCE, es necesario poder marcar de forma diferente las cromátidas hermanas, cosa que se consigue mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) al DNA cromosómico durante dos ciclos celulares.

Se exponen células de mamífero *in vitro* a la sustancia objeto de estudio en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógena de mamífero, si procede, y se cultivan durante dos ciclos de replicación en un medio que contenga BrdU. Después del tratamiento con un inhibidor del huso (por ejemplo, colchicina) para acumular las células en fase de mitosis de tipo metafásico (c-metafase), se recolectan las células y se realizan preparaciones de cromosomas.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

— Pueden utilizarse en el ensayo cultivos primarios (linfocitos humanos) o líneas celulares establecidas (por ejemplo, células ováricas de hámster chino). Las líneas celulares se controlarán en busca de una posible contaminación por mycoplasma.

— Se utilizarán medios de cultivo y condiciones de incubación (por ejemplo, temperatura, recipientes de cultivo, concentración de CO_2 y humedad) adecuados.

— Las sustancias estudiadas pueden prepararse en medios de cultivo, o disolverse o suspenderse en vehículos apropiados, antes del tratamiento de las células. La concentración final de un vehículo en el sistema de cultivo no debe influir de modo notable en la viabilidad ni en el índice de crecimiento de las células, y los efectos sobre la frecuencia de SCE se controlarán con ayuda de un control del disolvente.

▼B

— Las células se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica exógeno de mamífero. Por otro lado, cuando se utilicen tipos de células con actividad metabólica intrínseca, el grado y la naturaleza de la actividad deben ser apropiados para la clase química objeto de estudio.

Condiciones del ensayo

Número de cultivos

Para cada ensayo, se utilizarán dos cultivos separados, por lo menos.

Uso de controles positivos y negativos

Deben incluirse en cada experimento controles positivos en los que se utilicen una sustancia con acción directa y otra que precisa activación metabólica; también ha de utilizarse un control para el vehículo.

A continuación facilitamos ejemplos de sustancias que pueden utilizarse como controles positivos:

— compuesto de acción directa: etilmetanosulfonato,

— compuesto de acción indirecta: ciclofosfamida.

En caso oportuno, puede incluirse un control positivo complementario de la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán al menos tres concentraciones de la sustancia objeto de estudio, escalonadas debidamente. La concentración máxima producirá un efecto tóxico significativo, pero no impedirá una replicación celular adecuada. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad por métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta se determinará en cada caso.

Procedimiento

Preparación de los cultivos

Líneas celulares establecidas, derivadas de cultivos madre (por ejemplo, por tripsinización o agitación), se siembran con la densidad adecuada en recipientes de cultivo y se incuban a 37 ºC. En los cultivos de una sola capa celular, el número de células por recipiente de cultivo debe ajustarse de modo que los cultivos no confluyan en más del 50 % en el momento de la recogida. También es posible utilizar las células en forma de un cultivo en suspensión. Los cultivos de linfocitos humanos se preparan a partir de sangre heparinizada por medio de técnicas apropiadas, y se incuban a 37 ºC.

▼B

Tratamiento

Se expone a células en fase de crecimiento exponencial a la sustancia analizada durante un período de tiempo apropiado; en la mayoría de los casos pueden bastar una o dos horas, pero en determinadas circunstancias puede prolongarse el período de tratamiento hasta abarcar dos ciclos celulares completos. Las células sin actividad metabólica intrínseca deben exponerse a la sustancia estudiada en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia estudiada *y* se cultivan en presencia de BrdU durante dos ciclos de replicación. Otro método consiste en exponer simultáneamente las células a la sustancia y BrdU durante dos ciclos celulares completos.

Los cultivos de linfocitos humanos se tratan mientras se encuentran en un estado semisincrónico.

Las células se examinan en su segunda división tras el tratamiento, con lo que se garantiza la exposición de las fases más sensibles del ciclo celular a la sustancia estudiada. Todos los cultivos a los que se añada BrdU se manipularán en la oscuridad o con iluminación débil de lámparas incandescentes hasta la recolección de las células, a fin de reducir la fotolisis del DNA que contenga BrdU.

Recolección de las células

Los cultivos celulares se tratan con un inhibidor del huso (por ejemplo, colchicina) de 1 a 4 horas antes de la recolección. Cada cultivo se recolecta y trata por separado para la preparación de los cromosomas.

Preparación y teñido de los cromosomas

Las preparaciones de cromosomas se realizan por métodos citogenéticos estándar. Existen varias técnicas para teñirlos de forma que se aprecien los SCE (por ejemplo, el método de fluorescencia con Giemsa).

Análisis

El número de células analizadas dependerá de la frecuencia espontánea de control de SCE. Por lo general, se analizan al menos 25 metafases bien escalonadas por cultivo para contar los SCE. Las preparaciones reciben un código antes del análisis. En linfocitos humanos, solo se analizan las metafases que contienen 46 centrómeros. En las líneas celulares establecidas, solo se analizan las metafases que contienen ± 2 centrómeros del número modal. Se precisará si una inversión del marcado en el centrómero se considera SCE. Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas. El número de SCE para cada metafase y el de SCE por cromosoma han de facilitarse por separado para todos los cultivos tratados y de control.

Los resultados se analizarán por métodos estadísticos adecuados.

▼B

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— células utilizadas, métodos de mantenimiento del cultivo celular

— condiciones del ensayo: composición de los medios, concentración de CO_2, concentración de la sustancia estudiada, vehículo empleado, temperatura de incubación, período de tratamiento, inhibidor del huso utilizado, su concentración y duración del tratamiento con él, tipo de sistema de activación de mamífero utilizado, controles positivos y negativos,

— número de cultivos celulares por ensayo,

— detalles de la técnica utilizada para la preparación de las extensiones,

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

— número medio de SCE por célula y por cromosoma (datos facilitados por separado para cada cultivo),

— criterio de recuento de los SCE,

— justificación de la elección de las dosis,

— relación dosis-respuesta, si es posible,

— evaluación estadística,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.20. **ENSAYO DE LETALIDAD RECESIVA LIGADA AL SEXO EN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba de letalidad recesiva ligada al sexo (SLRL) practicada con *Drosophila melanogaster* descubre la aparición de mutaciones (lo mismo mutaciones puntuales que pequeñas deleciones) en la línea germinal del insecto. Se trata de un análisis de mutación capaz de descubrir mutaciones en unos 800 loci de cromosoma X, lo que supone alrededor del 80 % del total de loci existentes. El cromosoma X supone aproximadamente una quinta parte del genoma haploide completo.

Las mutaciones del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* se expresan fenotípicamente en los machos portadores del gen mutante. Cuando la mutación es letal en el estado hemicigoto, se deduce su presencia por la falta de uno de los grupos de descendencia masculina de los dos producidos normalmente por una hembra heterocigota. La prueba SLRL aprovecha estas circunstancias por medio de cromosomas marcados especialmente y con reordenaciones de su estructura.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Animales de experimentación

Pueden utilizarse machos de un linaje de tipo salvaje bien definido, y hembras de linaje Muller-5. También cabe emplear otros linajes de hembras debidamente marcadas con cromosomas X invertidos de manera múltiple.

Sustancia objeto de estudio

Las sustancias estudiadas se disuelven en agua. Las que sean insolubles en agua pueden disolverse o suspenderse en vehículos apropiados (por ejemplo, una mezcla de etanol y Tween-60 u 80), para diluirse luego en agua o solución salina antes de la administración. Se evitará el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo.

▼B

Número de animales

Se determinarán previamente la sensibilidad y la potencia de la prueba. La frecuencia de mutantes espontáneos observada en el control apropiado influirá intensamente en el número de cromosomas tratados que deba analizarse.

Vía de administración

La exposición puede ser oral, por inyección o por exposición a gases o vapores. La sustancia objeto de estudio puede administrarse en una solución azucarada. Cuando sea necesario, pueden disolverse las sustancias en una solución de ClNa al 0,7 % e inyectarlas así en el tórax o el abdomen.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán controles negativos (vehículo) y positivos. No obstante, si el laboratorio dispone de datos de controles publicados adecuados, no son necesarios controles simultáneos.

Niveles de exposición

Se utilizarán tres niveles de exposición. Para una evaluación preliminar, puede utilizarse un solo nivel de exposición de la sustancia analizada, que corresponderá a la concentración máxima tolerada o a la que produzca ciertos signos de toxicidad. Cuando se trate de sustancias atóxicas, ha de utilizarse la exposición en la concentración máxima posible.

Procedimiento

Se tratan machos de fenotipo salvaje (de tres a cinco días de edad) con la sustancia objeto de estudio y se aparean individualmente con varias hembras vírgenes del linaje Muller-5, o de otro debidamente marcado (con cromosomas invertidos de manera múltiple). Las hembras se sustituyen por vírgenes nuevas cada dos o tres días para cubrir el ciclo germinal completo. Se examina luego la descendencia de estas hembras para apreciar los efectos letales correspondientes a los efectos sobre el esperma maduro, las espermátidas en estadios precoces, medios y tardíos, los espermatocitos y los espermatogonios en el momento del tratamiento.

Las hembras F_1 heterocigotas procedentes de los cruces anteriores se aparean individualmente (es decir, una hembra por vial) con sus hermanos. En la generación F_2, se examina cada cultivo para descubrir la ausencia de machos del tipo salvaje. Si un cultivo parece proceder de una hembra F_1 portadora de un gen letal en el cromosoma X paterno (es decir, no se observa ningún macho portador del cromosoma tratado), se pondrán a prueba las hijas de esta hembra que presenten el mismo genotipo para comprobar si la letalidad se repite en la generación siguiente.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que se consignen el número de cromosomas estudiados, el de machos infértiles y el de cromosomas letales en cada concentración de exposición y en cada período de apareamiento, para cada macho tratado. Se indicará el número de grupos de tamaños diferentes por macho. Los resultados se confirmarán en un experimento independiente.

▼B

Se utilizarán métodos estadísticos apropiados para evaluar el ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo. El reagrupamiento de genes letales recesivos procedentes de un solo macho se tendrá en cuenta y se evaluará por un método estadístico adecuado.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— linajes o cepas de *Drosophila* empleados, edad de los insectos, número de machos tratados, número de machos estériles, número de cultivos F_2 establecidos, número de cultivos F_2 sin progenie, número de cromosomas portadores de un gen letal encontrado en cada estadio de la célula germinal,

— criterios adoptados para determinar el tamaño de los grupos tratados,

— condiciones de la prueba: descripción detallada del programa de tratamiento y muestreo, niveles de exposición, datos de toxicidad, controles negativos (disolvente) y positivos si procede,

— criterios de recuento de las mutaciones letales,

— relación exposición/efecto, si es posible,

— evaluación de los datos,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.21. **ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO***

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Es posible utilizar sistemas de cultivo de células de mamífero para descubrir modificaciones fenotípicas *in vitro* inducidas por sustancias químicas asociadas con transformación maligna *in vivo*. Entre las células de uso más frecuente figuran C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, rata Fisher; las pruebas se basan en modificaciones de la morfología celular, la formación de focos o modificaciones vinculadas con el crecimiento o no en agar semisólido. Existen sistemas, empleados con menor frecuencia, que ponen de manifiesto otras alteraciones fisiológicas o morfológicas en las células tras exposición a sustancias químicas carcinogénicas. Ninguno de los criterios analizados en estas pruebas *in vitro* tiene una relación de mecanismo establecida con el cáncer. Algunos de los sistemas de prueba son capaces de descubrir promotores tumorales. Puede determinarse la citotoxicidad averiguando el efecto de la sustancia estudiada sobre la capacidad de formación de colonias (eficacia de clonado) o los índices de crecimiento de los cultivos. La determinación de la citotoxicidad tiene por objeto establecer si la exposición a la sustancia analizada ha sido toxicológicamente significativa, pero no permite calcular la frecuencia de transformaciones en todas las pruebas, dado que en algunas de estas pueden ser necesarias una incubación prolongada, una nueva siembra o ambas.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCION DEL MÉTODO

Preparativos

Células

Según la prueba de transformación que se realice, pueden utilizarse líneas celulares o células primarias diversas. El investigador se encargará de que las células que se empleen presenten la modificación fenotípica apropiada tras exposición a sustancias carcinogénicas conocidas, y de que la fiabilidad y la validez de la prueba efectuada en su laboratorio estén contrastadas por datos documentados.

Medio

Se utilizarán medios y condiciones experimentales apropiados para la prueba de transformación elegida.

▼B

Sustancia objeto de estudio

Las sustancias puestas a prueba pueden prepararse en medios de cultivo, disolverse o suspenderse en vehículos apropiados antes de tratar las células. La concentración final del vehículo en el medio de cultivo no influirá en la viabilidad de las células, el índice de crecimiento ni en la incidencia de transformación.

Actividad metabólica

Las células se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica de mamífero apropiado. Cuando se utilicen tipos celulares con actividad metabólica intrínseca, deberá saberse si la naturaleza de la actividad es apropiada para la clase química analizada.

Condiciones del ensayo

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán en cada experimento controles positivos a base de una sustancia de acción directa y otra que precise activación metabólica; también se utilizará un control negativo (vehículo).

A continuación se ofrecen ejemplos de sustancias que pueden emplearse como controles positivos:

— Compuestos de acción directa:

  — etilmentanosulfonato

  — β-propiolactona

— Compuestos que precisan activación metabólica:

  — 2-acetilaminofluoreno

  — 4-dimetilaminoazobenceno

  — 7,12-dimetilbenzantraceno

Cuando se juzgue oportuno, se incluirá un control positivo complementario perteneciente a la misma clase química que la sustancia estudiada.

Concentraciones de exposición

Se utilizarán varias concentraciones de la sustancia objeto de estudio, que producirán un efecto tóxico acorde con su potencia; así, la concentración máxima provocará una supervivencia escasa, mientras que la supervivencia con la concentración mínima será aproximadamente igual a la encontrada en el control negativo. Las sustancias relativamente insolubles en agua se estudiarán hasta el límite de solubilidad por medio de métodos apropiados. En lo que respecta a las sustancias atóxicas claramente hidrosolubles, la concentración más alta de la sustancia estudiada se determinará en cada caso.

▼B

Procedimiento

Las células deben exponerse durante un período de tiempo adecuado, que dependerá del sistema celular utilizado; por tanto, quizá sea necesario un nuevo tratamiento, acompañado de un cambio de medio (y, en caso preciso, de una nueva mezcla de activación metabólica), si la exposición es prolongada. Las células carentes de actividad metabólica intrínseca suficiente se expondrán a la sustancia estudiada en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica apropiado. Al final del período de exposición, se lavan las células hasta eliminar la sustancia analizada y se cultivan en condiciones que permitan la aparición del fenotipo transformado en estudio; se determina también la incidencia de esta transformación. Todos los resultados se confirman en un experimento independiente.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas que recogerán datos diversos según el método que se utilice, como, por ejemplo, recuentos por placa, placas positivas o número de células transformadas. Cuando proceda, se expresará el índice de supervivencia en porcentaje de los índices de control y frecuencia de transformación a modo del número de células transformadas frente al de supervivientes. Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— tipo de célula utilizado, número de cultivos celulares, métodos de mantenimiento de los cultivos celulares,

— condiciones del ensayo; concentración de la sustancia estudiada, vehículo utilizado, período de incubación, duración y frecuencia del tratamiento, densidad celular durante el tratamiento, tipo de sistema de activación metabólica exógena utilizado, controles positivos y negativos, especificación del fenotipo estudiado, sistema selectivo empleado (si procede), justificación de la elección de las dosis,

— método utilizado para contar las células viables y transformadas,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.22. **ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La letalidad dominante provoca la muerte del embrión o feto. Su inducción por exposición a una sustancia química indica que esta ha alterado el tejido embrionario de la especie estudiada. Se admite generalmente que la letalidad dominante se debe a una lesión cromosómica (anomalías estructurales y numéricas). Si los animales tratados son hembras, la muerte del embrión también puede deberse a efectos tóxicos.

En general, los machos se exponen a la sustancia objeto de estudio y se aparean con hembras vírgenes no tratadas. Es posible investigar por separado los distintos estadios de las células embrionarias gracias al empleo de intervalos de apareamiento sucesivos. Un número de implantes muertos por hembra, en el grupo tratado, superior al observado en el grupo de control, es reflejo de las pérdidas tras la implantación. Por otro lado, es posible calcular las pérdidas antes de ella mediante recuento de los cuerpos lúteos, o por comparación entre número total de implantes por hembra en los grupos tratados y los de control. El efecto total de letalidad dominante es igual a la suma de las pérdidas antes y después de la implantación. El cálculo de tal efecto se basa en la comparación del número de implantes vivos por hembra, en el grupo de prueba, en relación con el registrado para el grupo de control. Una reducción del número de implantes en determinados intervalos puede deberse a destrucción de células (es decir, de espermatocitos, espermatogonios o ambos).

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias objeto de estudio se disolverán o suspenderán en solución salina isotónica. Las sustancias químicas insolubles en agua pueden disolverse o suspenderse en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no alterará el compuesto estudiado ni producirá efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

▼B

Condiciones del ensayo

Vía de administración

En general, la sustancia estudiada solo debe administrarse una vez, aunque cabe utilizar un programa de tratamiento reiterado si lo aconseja la información toxicológica disponible. Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal. Pueden ser apropiadas otras vías de administración.

Animales de experimentación

Se recomienda utilizar ratas o ratones, jóvenes y en plena madurez sexual, que se distribuirán al azar para formar grupos de tratamiento y de control.

Número y sexo

Se utilizará un número apropiado de machos tratados, teniendo en cuenta la frecuencia espontánea del carácter biológico evaluado según la cepa empleada. El número elegido se basará en la sensibilidad de detección y el grado de significación, determinados previamente. Por ejemplo, en un experimento tipo, el número de machos en cada grupo posológico deberá ser suficiente para obtener alrededor de 30 a 50 hembras grávidas por período de apareamiento.

Uso de controles negativos y positivos

Se incluirán simultáneamente en cada experimento controles positivos y negativos (vehículos). Cuando se disponga de resultados aceptables obtenidos con controles positivos en experimentos recientes en el mismo laboratorio, podrán emplearse en lugar de un control positivo simultáneo. En lo que respecta a las sustancias de control positivas, se utilizará una dosis baja apropiada (por ejemplo, MMS, intraperitonalmente, 10 mg/kg) para demostrar la sensibilidad de la prueba.

Dosis

Normalmente, se utilizan tres niveles posológicos. La dosis alta producirá signos de toxicidad o reducirá la fecundidad de los animales tratados. En determinados casos, puede bastar un solo nivel posológico alto.

Prueba de límite

Las sustancias atóxicas se estudian en concentración de 5 g/kg en caso de administración única, y de 1 g/kg/día en caso de administración reiterada.

Procedimiento

Hay varios esquemas de tratamiento posibles. El método más frecuente es el de la administración única, pero pueden utilizarse otros.

Cada macho se aparea de forma secuencial con 1 o 2 hembras vírgenes no tratadas, a intervalos de tiempo apropiados tras el tratamiento. Las hembras se mantendrán con los machos durante al menos un ciclo estral completo o hasta que se compruebe el apareamiento por la presencia de esperma en la vagina o por la existencia de tapón vaginal.

▼B

El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de tratamiento, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de células embrionarias tras el tratamiento.

Las hembras se sacrifican en la segunda mitad de la gestación para examinar el contenido de su útero y determinar el número de implantes vivos y muertos. Pueden inspeccionarse los ovarios para averiguar el número de cuerpos lúteos.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de machos, el de hembras grávidas y el de hembras no grávidas. Se facilitarán por separado los resultados de cada apareamiento, incluida la identidad de cada macho y hembra. Se recogerán, para cada hembra, la semana de apareamiento y la dosis recibida por los machos, así como las frecuencias de implantes vivos y muertos.

El cálculo del efecto total de la letalidad dominante se basa en la comparación del número de implantes vivos por hembra en el grupo tratado y en el de control. Se analiza la relación entre implantes vivos y muertos en el grupo tratado, en comparación con la obtenida en el grupo de control, para deducir las pérdidas tras la implantación.

Si se registran los datos en forma de muertes precoces y tardías, se indicará claramente esta diferencia en las tablas. Si se calculan las pérdidas antes de la implantación, debe informarse de ellas. Tales pérdidas pueden calcularse a modo de diferencias entre el número de cuerpos lúteos y el de implantes, o de reducción del número medio de implantes por hembra en relación con los apareamientos de control.

Los resultados se evaluarán por métodos estadísticos apropiados.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie, cepa, edad y pesos de los animales utilizados, número de animales de cada sexo en los grupos tratados y controles,

— sustancia estudiada, vehículo, niveles posológicos ensayados y justificación de su elección, controles negativos y positivos, datos relativos a la toxicidad,

— vía y programa de tratamiento,

— programa de apareamiento,

— método utilizado para comprobar el apareamiento,

— momento del sacrificio,

— criterios de recuento de los efectos de la letalidad dominante,

— relación dosis-respuesta, si es posible,

▼B

— evaluación estadística,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIAS DE MAMÍFERO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 483 sobre el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero tiene por objeto detectar sustancias que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en espermatogonias de mamífero (1) (2) (3) (4) (5). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. La mayoría de los mutágenos químicos dan lugar a aberraciones cromatídicas, aunque también pueden producirse aberraciones cromosómicas. El presente método no está pensado para detectar aberraciones numéricas ni se emplea habítualmente con ese fin. Las mutaciones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas.

El presente ensayo detecta alteraciones cromosómicas en las células germinales de las espermatogonias y debería, por tanto, permitir prever la inducción de mutaciones hereditarias en las células germinales.

El ensayo suele realizarse con roedores; es un ensayo citogenético *in vivo* que detecta aberraciones cromosómicas en las mitosis de las espermatogonias. El presente método no se refiere a otras células diana.

Para detectar aberraciones cromatídicas en las espermatogonias es preciso analizar la primera mitosis celular después del tratamiento, antes de que las lesiones desaparezcan en las divisiones celulares siguientes. Puede obtenerse información adicional del análisis de los cromosomas meióticos de células madre de espermatogonias tratadas, para detectar aberraciones cromosómicas de la diacinesis a la metafase I cuando las células tratadas se convierten en espermatocitos.

El presente ensayo *in vivo* está diseñado para determinar si los mutágenos de las células somáticas también son activos en las células germinales. Asimismo, está indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo,* de la toxicocinética y de los procesos de reparación del ADN.

Los testículos contienen varias generaciones de espermatogonias, que presentan distinta sensibilidad al tratamiento químico. Por tanto, las aberraciones detectadas corresponden a una respuesta global de las poblaciones de espermatogonias tratadas, en las que predominan las células diferenciadas, que son las más numerosas. Según su localización en el testículo y debido a la barrera física y fisiológica de las células de Sertoli, así como a la barrera entre la sangre y el testículo, algunas generaciones de espermatogonias están expuestas a la circulación general y otras no.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo o un metabolito reactivo no llegan al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Aberración cromatídica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de una cromátida o la rotura y reunión de cromátidas.

Aberración cromosómica: lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura o en en la rotura y reunión de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Gap: lesión acromática más estrecha que la cromátida, con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Aberracción numérica: número de cromosomas distinto del número normal propio de los animales empleados.

Poliploidía: un múltiplo del número de dotación cromosómica haploide (n) superior al diploide (3n, 4n, etc.).

Aberración estructural: alteración de la estructura cromosómica (deleciones, intracambios o intercambios) detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales a la sustancia de ensayo por una vía adecuada y se sacrifican a intervalos apropiados tras el tratamiento. Antes de sacrificarlos, se les administra una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células germinales y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromo-sómicas.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Selección de la especie animal*

Si bien suelen emplearse hámsters chinos y ratones machos, pueden utilizarse machos de otra especie de mamíferos apropiada. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio.

1.4.1.2. *Alojamiento y alimentación de los animales*

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la Introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3. *Preparación de los animales*

Se reparten al azar machos adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los acostumbra a las condiciones de laboratorio durante al menos cinco días antes de empezar el estudio.

▼B

1.4.1.4. *Preparación de las dosis*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

1.4.2.2. *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en cada ensayo. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos deberían producirse aberraciones cromosómicas estructurales en las espermatogo-nias *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto al nivel de fondo.

Las dosis del control positivo deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen immediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. La sustancia empleada en el control positivo podrá administrarse por una vía distinta de la empleada para la sustancia de ensayo y la toma de muestras podrá realizarse una sola vez. Podrá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Sustancia	N° CAS	N° EINECS
Ciclofosfamida Monohidrato de ciclofosfamida	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Ciclohexilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Monómero de acrilamida	79-06-1	201-173-7
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Salvo que haya datos anteriores sobre controles que pongan de manifiesto una variabilidad entre animales y una frecuencia de células con aberraciones cromosómicas aceptables, se realizarán, para cada período de muestreo, controles negativos únicamente con el disolvente o vehículo, y se tratarán, por lo demás, de igual manera que los lotes tratados. Se realizarán asimismo controles sin tratar, salvo que exista información anterior o publicada sobre controles que demuestre que el disolvente o vehículo elegido no induce efectos nocivos ni mutágenos.

▼B

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número de animales**

Los lotes tratados y los controles han de estar compuestos al menos por cinco machos analizables cada uno.

1.5.2. **Pauta de tratamiento**

Las sustancias de ensayo se administrarán preferiblemente una o dos veces (uno o dos tratamientos), aunque también puede dividirse la dosis —por ejemplo, en dos veces al día separadas por algunas horas como máximo— con el fin de facilitar la administración de grandes cantidades. Si se siguen otras pautas debe justificarse científicamente.

En el lote al que se ha administrado la dosis máxima se toman dos muestras tras el tratamiento. Dado que la sustancia de ensayo puede afectar a la cinética del ciclo celular, suele tomarse la primera muestra hacia las 24 horas y la segunda, unas 48 horas después del tratamiento. En los demás lotes se toma una muestra transcurridas 24 horas o un período de 1,5 veces la duración del ciclo celular desde el tratamiento, salvo que se conozca otro período de muestreo más adecuado para detectar los efectos estudiados (6).

Pueden seguirse otros períodos de muestreo. Por ejemplo, en el caso de sustancias que puedan provocar la pérdida de cromosomas o tener efectos independientes de la fase S, pueden estar indicados períodos de muestreo más cortos (1).

Debe valorarse caso por caso la pertenencia de una pauta de administración repetida. Si se aplica una pauta de ese tipo, los animales deben sacrificarse 24 horas (1,5 veces la duración del ciclo celular) después de la última administración. Cuando proceda, pueden aplicarse períodos de muestreo complementarios.

Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se extraen las muestras transcurrido un plazo oportuno, que en el caso de los ratones es de unas 3 a 5 horas y en el de los hámsters chinos, de unas 4 a 5 horas.

1.5.3. **Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa y protocolo de tratamiento que el estudio principal (7). Si se produce toxicidad, se administrarán tres dosis distintas para el primer período de muestreo. La gama de dosis deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula. En el último período de muestreo se administrará únicamente la dosis máxima. Se entenderá por «dosis máxima» la que produzca tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo resultaría problamente letal.

▼B

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitó-genos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en las espermatogonias (por ejemplo, disminución de la proporción entre el número de mitosis de las espermatogonias y el número de metafases I y II de la meiosis; la disminución no ha de ser superior al 50 %).

1.5.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal/día administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo con tres dosis diferentes. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada, o bien por inyección intraperitoneal. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a este. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6. **Preparación de los cromosomas**

Immediatamente después del sacrificio, se preparan suspensiones con células de uno o ambos testículos, se tratan con una solución hipotónica y se fijan. A continuación, se distribuyen las células en portaobjetos y se tiñen.

1.5.7. **Análisis**

Deben analizarse al menos 100 metafases bien extendidas de cada animal (es decir, un mínimo de 500 meta-fases por lote). La cantidad puede ser menor si se observan numerosas aberraciones. Antes de analizarlos al microscopio, se asigna un código independiente a cada portaobjetos, incluidos los controles positivos y negativos. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la pérdida de cromosomas, las células analizadas deben contener un número de centrómeros iqual a $2n \pm 2$.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de tabla. La unidad experimental es el animal. Se determinará en cada animal la cantidad de células con aberraciones cromosómicas estructurales y el número de aberraciones cromosómicas por célula. Se hará una relación de los distintos tipos, el número y la frecuencia de dichas aberraciones en los lotes tratados y los controles. Los gaps se registrarán por separado y se recogerán en el informe, pero por lo general no se incluirán en la frecuencia total de aberraciones.

▼B

Si se observan tanto mitosis como meiosis, se determinará la relación entre las mitosis de espermatogonias y la primera y segunda metafases meióticas en una muestra de 100 células en división por cada animal de los lotes tratados y de los controles negativos, con el fin de establecer si ha habido citotoxicidad. Si se observan mitosis únicamente, se determinará el índice mitótico al menos en 1 000 células por animal.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo (aumento de la proporción de células con aberraciones cromosómicas relacionado con la dosis, claro aumento del número de células que presentan aberraciones en un lote al que se ha administrado una sola dosis y en el que se ha realizado una única toma de muestras, etc.). Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (8). El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva. Los resultados dudosos deberán aclararse mediante más ensayos en los que convendría modificar las condiciones experimentales.

No se considerarán mutágenas en el ensayo en cuestión las sustancias que den lugar a resultados que no se ajusten a los criterios anteriores.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca aberraciones cromosómicas estructurales en las células germinales de la especie estudiada. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca aberraciones cromosómicas en las células germinales de la especie estudiada.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo o sus metabolitos lleguen al tejido diana.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número y edad de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,

— peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

▼B

Condiciones del ensayo:

— datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,

— fundamento de la selección de la dosis,

— fundamento de la elección de la vía de administración,

— preparación de la sustancia de ensayo,

— administración de la sustancia de ensayo,

— fundamento de la elección del momento del sacrificio,

— conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,

— calidad de los alimentos y el agua,

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— sustancia que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento,

— métodos de preparación de los portaobjetos,

— criterios de recuento de las aberraciones,

— número de células analizadas por animal,

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

— signos de toxicidad,

— índice mitótico,

— proporción entre el número de mitosis de espermatogenias y el número de metafases I y II de la meiosis,

— tipo y número de aberraciones observadas en cada animal,

— número total de aberraciones por lote,

— número de células con aberraciones por lote,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos, si se han realizado,

— datos de los controles negativos realizados en paralelo,

— datos anteriores sobre controles negativos, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— datos de los controles positivos realizados en paralelo,

— variaciones de la ploidía, en su caso.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

▼B

4. **REFERENCIAS**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifkations, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals*, *Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis,* Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I. D. (1984). Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 27 5-306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics,* 3, pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D., G., and Henderson L. (1990), *ln Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res., 52,* pp. 207-209.

(6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res., 312,* pp. 313-318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *ln Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *ln Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Slatistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.24. **ENSAYO DE LA MANCHA EN EL RATÓN**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se trata de una prueba que se realiza *in vivo* en ratones, cuyos embriones en desarrollo se exponen a la sustancia estudiada. Las células efectoras de los embriones en desarrollo son los melanoblastos, y los genes efectores son los responsables de la pigmentación del pelo. Los embriones son heterocigotos para cierto número de estos genes. Una mutación en el alelo dominante de tal gen o su pérdida (a consecuencia de fenómenos genéticos diversos) en un melanoblasto provoca la expresión del fenotipo recesivo en sus células descendientes, con la aparición consiguiente de una mancha de otro color en el pelo del ratón resultante. Se cuenta el número de descendientes portadores de manchas (mutaciones), y se compara su frecuencia con la observada en la descendencia procedente del desarrollo de embriones tratados únicamente con el disolvente. La prueba de la mancha en el ratón descubre supuestas mutaciones somáticas en las células fetales.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Cuando sea posible, las sustancias se disuelven u suspenden en solución salina isotónica. Las que sean insolubles en agua se disolverán o suspenderán en vehículos apropiados. El vehículo utilizado no debe alterar la sustancia estudiada ni provocar efectos tóxicos. Deben emplearse preparaciones recientes de la sustancia objeto de estudio.

Animales de experimentación

Se aparean animales de la cepa T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con la cepa HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, in fz/ln fz; pearlpe/pe) o con la C57 BL (nonagouti, a/a). Pueden utilizarse otros cruces apropiados, como entre NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) y DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), siempre que produzcan descendencia nonagouti.

▼B

Número y sexo

Se tratan hembras grávidas suficientes para obtener un número de descendientes vivos apropiado para cada nivel posológico utilizado. El tamaño de la muestra dependerá del número de manchas observadas en los ratones tratados y de la importancia del número de datos de control. Solo se considerará aceptable un resultado negativo si se han examinado al menos 300 descendientes de hembras tratadas con la dosis máxima.

Uso de controles negativos y positivos

Ha de disponerse de datos de control simultáneos procedentes de ratones tratados solo con el vehículo (controles negativos). Pueden agruparse datos de control históricos obtenidos en el mismo laboratorio para mejorar la sensibilidad de la prueba, siempre que tales datos sean homogéneos. Si la sustancia analizada no resulta ser mutágena, deberá disponerse de datos de control positivos obtenidos en fecha reciente en el mismo laboratorio con una sustancia de potencial mutágeno conocido en esta prueba.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal de las hembras grávidas. Cuando convenga, se recurrirá al tratamiento por inhalación u otras vías de administración.

Dosis

Se utilizan al menos dos niveles posológicos, incluido uno que origine signos de toxicidad o reduzca el tamaño de las camadas. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima practicable.

Procedimiento

Normalmente, se administra un tratamiento único los días 8,9 o 10 de la gestación, considerando como día 1 aquel en que se observe por primera vez el tapón vaginal. Estos días corresponden, a 7,25, 8,25 y 9,25 días tras la concepción. Pueden efectuarse, pasados estos días, tratamientos sucesivos.

Análisis

Al cabo de tres o cuatro semanas del nacimiento, se asignan códigos a la descendencia y se comprueba si existen manchas. Se distinguen tres clases de manchas:

a) las manchas blancas a menos de 5 mm de la línea mesoventral, que se suponen consecuencia de muerte celular (WMVS),

b) las manchas amarillas, de tipo agouti, asociadas con los pezones, los órganos sexuales, la garganta, las regiones axilar e inguinal y la parte central de la frente, que se suponen debidas a falta de diferenciación (MDS), y

c) las manchas pigmentadas y blancas repartidas al azar por el pelaje, que se creen resultado de mutaciones somáticas (RS).

▼B

Se cuentan las tres clases, pero solo la última, la RS, tiene significación genética. Los problemas que plantea la diferenciación de las clases MDS y RS pueden solucionarse examinando muestras de pelo con el microscopio de fluorescencia.

Se observarán las anomalías morfológicas macroscópicas evidentes de la descendencia.

2. **RESULTADOS**

Los datos se presentarán en forma del número total de crías examinadas y del número de las que presenten una o varias manchas supuestamente debidas a mutación somática. Se compararán por métodos apropiados los datos de los animales tratados y los controles negativos. Asimismo, se ofrecerán los resultados considerando la camada como unidad.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— cepas utilizadas en el cruce,

— número de hembras grávidas en los grupos experimental y de control,

— tamaño medio de las camadas en los grupos experimentales y de control en el nacimiento y al destete,

— dosis de la sustancia estudiada,

— disolvente utilizado,

— día de la gestación en que se administró el tratamiento,

— vía de administración,

— número total de descendientes examinados, y número con WMVS, MDS y RS en los grupos experimental y de control,

— anomalías morfológicas macroscópicas,

— relación dosis/respuesta de RS, si es posible,

— evaluación estadística,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.25. **TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba de translocación hereditaria en el ratón descubre alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas en las células embrionarias de mamíferos, tal como se ponen de manifiesto en la descendencia de primera generación. Los tipos de alteraciones cromosómicas apreciados son translocaciones recíprocas y, si se incluye la descendencia femenina, pérdida del cromosoma X. Los portadores de translocaciones y las hembras XO muestran una fertilidad reducida que permite la selección de una descendencia F_1 para practicar un análisis citogenético. Una esterilidad total es consecuencia de tipos de translocación determinados (autosoma X y tipo c-t). Las translocaciones se observan citogenéticamente en las células meióticas en diacinesis-metafase I de los individuos machos, ya sean machos F_1 o hijos de hembras F_1. Las hembras XO se identifican citogenéticamente por la presencia de solo 39 cromosomas en las mitosis de la médula ósea.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles en agua, se disuelven o suspenden en vehículos apropiados. Se emplean soluciones recién preparadas de la sustancia estudiada. Si se utiliza un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar el compuesto analizado ni provocar efectos tóxicos.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras vías.

Animales de experimentación

Para facilitar la reproducción y la verificación citológica, estos experimentos se realizan con ratones; no es preciso que sean de una cepa determinada. Sin embargo, el tamaño medio de una camada de la cepa empleada deberá ser superior a 8, y relativamente constante.

Se utilizarán animales sanos y sexualmente maduros.

▼B

Número de animales

El número de animales necesario depende de la frecuencia de translocaciones espontáneas, así como del índice mínimo de inducción preciso para obtener un resultado positivo.

La prueba suele realizarse mediante análisis de la descendencia masculina F_1. Al menos 500 descendientes machos F_1 se analizan por grupo de dosis. Si se incluye la descendencia femenina F_1 son necesarios 300 machos y 300 hembras.

Uso de controles negativos y positivos

Debe disponerse de datos sobre controles adecuados procedentes de pruebas realizadas simultáneamente y de controles históricos. Si existen resultados aceptables de controles positivos procedentes de experimentos efectuados en fecha reciente en el mismo laboratorio, pueden utilizarse en lugar de un control positivo simultáneo.

Dosis

Se prueba una dosis, por lo general la máxima asociada con la producción de efectos tóxicos mínimos pero que no altere el comportamiento reproductor ni la supervivencia. Para establecer una relación dosis/respuesta, son necesarias otras dos dosis. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima posible.

Procedimiento

Tratamiento y apareamiento

Existen dos programas de tratamiento. De ellos, el más utilizado es la administración única de la sustancia estudiada. La sustancia también puede administrarse los 7 días de la semana durante 35 días. El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de administración, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de las células embrionarias tratadas. Al final del período de apareamiento, se coloca a las hembras en jaulas individuales. Cuando dan a luz, se registra la fecha, el tamaño de la camada y el sexo de los descendientes. Se desteta a toda la descendencia masculina y se descarta toda la femenina, salvo si se incluyen en el experimento.

Búsqueda de los heterocigotos de translocación

Se utiliza uno de los dos métodos posibles:

— estudio de la fertilidad de la descendencia F_1, y verificación posterior de posibles portadores de translocaciones por análisis citogenéticos,

— análisis citogenético de toda la progenie F_1 masculina sin selección previa mediante estudio de fertilidad.

a) Estudio de la fertilidad

Es posible determinar la fertilidad reducida de un individuo F_1 observando el tamaño de la camada, analizando el contenido uterino de su compañera femenina o por ambos medios.

Es necesario fijar los criterios de determinación de la fertilidad normal y reducida de la cepa de ratón utilizada.

▼B

Observación del tamaño de la camada: Los machos F_1 sometidos a estudio se colocan en jaulas individuales con hembras procedentes del mismo experimento o de la colonia. Las jaulas se inspeccionan a diario a partir de los 18 días tras el apareamiento. Se registran, en el momento del nacimiento, el tamaño de la camada y el sexo de la descendencia F_2, y se descartan luego las crías. Si se estudia la descendencia femenina F_1, se conserva la descendencia F_2 procedente de camadas pequeñas para un análisis en mayor profundidad. Las hembras portadoras de una translocación se someten a verificación por análisis citogenético de una translocación en cualquiera de sus descendientes machos. Las hembras XO se identifican por la modificación de sexos en su descendencia, que pasa de 1:1 a 1:2 machos/hembras. En un método secuencial, los machos F_1 normales no se someten a nueva verificación si la primera camada F_2 alcanza o supera un valor normal predeterminado; de lo contrario, se observan una segunda y una tercera camadas F_2.

Los animales F_1 que no puedan clasificarse como normales tras observación de hasta un máximo de tres camadas F_2 se someten a un nuevo control mediante análisis del contenido uterino de sus compañeras femeninas, o sufren directamente análisis citogenético.

Análisis del contenido uterino: La reducción del tamaño de las camadas en los portadores de translocaciones se debe a la muerte de embriones, por lo que un número alto de implantes muertos indica la presencia de una translocación en el animal sometido a la prueba. Cada macho F_1 estudiado se aparea con 2 o 3 hembras. Se comprueba si existe concepción mediante el examen matinal diario para descubrir la presencia de tapones vaginales. Las hembras se sacrifican 14 o 16 días después, y se registra el número de implantes vivos y muertos presentes en su útero.

b) Análisis citogenético

Se obtienen preparaciones de testículos por el método de secado con aire. Los portadores de translocaciones se identifican por la presencia de configuraciones multivalentes en diacinesis metafase I en los espermatocitos primarios. La observación de al menos dos células con una asociación multivalente constituye la prueba necesaria de que el animal estudiado es portador de una translocación.

Si no se ha realizado selección mediante análisis de la fecundidad, se practica estudio citogenético en todos los machos F_1. Deben analizarse al microscopio un mínimo de 25 células en diacinesis/metafase I por macho. En los machos F_1 con testículos pequeños y que presenten una detención meiótica antes de la diacinesis, o en las hembras F_1 que se sospeche sean XO, es necesario el examen de las metafases mitóticas en los espermatogonios o en la médula ósea. La presencia de un cromosoma desusadamente largo o corto en 10 células, demuestra la existencia de una translocación especial que origina la esterilidad del macho (tipo c-t). Algunas translocaciones X autosomas que provocan la esterilidad del macho solo pueden identificarse mediante un análisis de las bandas de cromosomas mitóticos. La presencia de 39 cromosomas en la totalidad de 10 micosis es demostrativa de un estado XO en una hembra.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

Se registran, en el nacimiento y el destete para cada período de apareamiento, el tamaño medio de las camadas y la relación entre sexos.

▼B

En lo que respecta a la evaluación de la fertilidad de los animales F_1, se expondrán el tamaño medio de las camadas procedentes de todos los apareamientos normales, así como el tamaño de cada una de las surgidas de animales F_1 portadores de translocación. En cuanto al análisis del contenido uterino, se harán constar el número medio de implantes vivos y muertos producto de apareamientos normales, y el de implantes vivos y muertos de cada apareamiento de portadores de translocación.

Respecto al análisis citogenético de la diacinesis-metafase I, se enumerarán el número de tipos diferentes de configuraciones multivalentes y el número total de células en cada portador de translocación.

Se comunicarán el número total de apareamientos y la duración del período de apareamiento de los individuos estériles F_1. Se facilitarán asimismo el peso de los testículos y detalles del análisis citogenético.

Para hembras XO, se dan resultados del tamaño medio de la camada, de la razón de sexos de la progenie F_2 y del análisis citogenético.

Cuando se preseleccionan, por pruebas de fertilidad, posibles F_1 portadores de translocación, las tablas deben incluir información relativa a cuántos de estos eran heterocigotos de translocación confirmados.

Se dan también datos de los experimentos de control negativo y control positivo.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DE LA PRUEBA

El informe incluirá los datos siguientes:

— cepa de ratones, edad de los animales, pesos de los animales tratados,

— número de animales reproductores de cada sexo en los grupos experimentales y de control,

— condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles de las dosis, disolventes, frecuencia de apareamientos,

— número y sexo de los descendientes por cada hembra, número y sexo de los descendientes criados para análisis de translocación,

— tiempos y criterios de análisis de translocación,

— número y descripción detallada de los portadores de translocación, incluyendo datos de reproducción y de contenido uterino, cuando proceda,

— procedimientos citogenéticos y detalles del análisis microscópico, preferiblemente con fotografías,

— evaluación estadística,

— discusión de resultados,

— interpretación de resultados.

▼B

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.26. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN ROEDORES

1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad oral subcrónica reproduce las directrices del documento OCDE TG 408 (1998).

1.1. INTRODUCCIÓN

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período prolongado, que abarque la maduración posterior al destete y el crecimiento hasta la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana.

El presente método hace especial hincapié en los parámetros neurológicos y proporciona una indicación de los efectos sobre el sistema inmunitario y la reproducción. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método sirve para detectar sustancias químicas que pueden tener efectos tóxicos sobre el sistema nervioso, inmunitario o los órganos reproductores, lo cual puede justificar la realización de estudios más exhaustivos.

Véase también la introducción general de la Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

Posología: termino general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante 90 días. A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo, así como a los que sobrevivan al final del mismo.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Estos se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto.

1.4.2. **Preparación de las dosis**

La sustancia de ensayo se administra por sonda o con el alimento o el agua de bebida. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en las condiciones de administración.

1.4.3. **Condiciones del ensayo**

1.4.3.1. *Animales de experimentación*

La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio habitual. Las hembras han de ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales empleados ha de ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando el ensayo se realice, como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios, animales de la misma cepa y procedencia.

1.4.3.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse por lo menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. Sobre la base de los conocimientos previos relativos a la sustancia química u otra sustancia muy próxima, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) en el control y con la dosis más elevada para observar la reversibilidad o persistencia de efectos tóxicos una vez finalizado el tratamiento. La duración del período de observación posterior al tratamiento ha de establecerse adecuadamente en función de los efectos observados.

▼B

1.4.3.3. *Posología*

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 1.4.3.4). Para establecer las dosis pueden emplearse los resultados de los estudios de administración continuada o de determinación de dosis y debe tomarse en consideración toda la información toxicológica y toxicocinética disponible sobre la sustancia de ensayo o productos afines. A menos que las características fisicoquímicas o los efectos biológicos de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis. La dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 6-10) entre dosis.

El lote de control no recibe la sustancia de ensayo, pero sí recibe el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se emplea un vehículo, el lote de control ha de recibir el mayor volumen utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para saber si la disminución se debe a las características organolépticas o a alteraciones toxicológicas del modelo de ensayo.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo; efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

1.4.3.4. *Ensayo límite*

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Administración de las dosis**

Las dosis de ensayo se administran diariamente a los animales durante 90 días. Cualquier otra posología, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal y no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

▼B

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dicta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de 90 días como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos.

1.5.2. **Observaciones**

El período de observación debe durar al menos 90 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite para las observaciones de seguimiento durante un período adecuado y sin tratamiento, a fin de detectar la persistencia o la desaparición de los efectos tóxicos.

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales. Se examinan todos los animales al menos dos veces al día, por lo general a primera y a última hora, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

Todos los animales deben someterse al menos a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (1).

Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, a ser posible en todos los animales, pero al menos en el lote con la dosis más alta y en el lote de control. Si se observan cambios oculares en esos animales, deben examinarse todos los demás.

Hacia el final del período de exposición, pero en ningún caso antes de la undécima semana, debe evaluarse la reactividad sensorial frente a estímulos de distintos tipos (1) (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos) (2) (3) (4), la fuerza de prensión (5) y la actividad motriz (6). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

Las observaciones funcionales hacia el final del estudio pueden omitirse si se dispone de datos sobre dichas observaciones realizadas en otros estudios y las observaciones clínicas diarias no ponen de manifiesto alteraciones funcionales.

▼B

De forma excepcional, también pueden omitirse las observaciones funcionales en los lotes que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.

1.5.2.1. *Peso corporal y consumo de alimentos y agua*

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales, medirse el consumo de alimentos y, si la sustancia de ensayo se administra con el agua de bebida, también el consumo de agua. Este último puede vigilarse, asimismo, en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra con los alimentos o mediante sonda y la ingestión de agua pueda verse alterada.

1.5.2.2. *Hematología y bioquímica clínica*

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado y conservarse, si procede, en condiciones adecuadas. Al final del período de ensayo, las muestras se toman justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio.

Deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos al final del período de ensayo y con las muestras tomadas a lo largo del mismo: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea.

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y especialmente en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de su sacrificio o como parte del método de sacrificio (aparte de los moribundos o sacrificados a lo largo del ensayo). Al igual que los exámenes hematológicos, los análisis de bioquímica clínica pueden realizarse en muestras tomadas en el transcurso del ensayo. Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras ([1]). Los parámetros medidos en el plasma y el suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, nitrógeno residual en sangre, creatinina, proteínas totales y albúmina, y al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina aminotrans-ferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa o sorbitol deshidroge-nasa). La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de ácidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

Pueden realizarse, con carácter facultativo, las siguientes determinaciones en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas.

Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores séricos de lesiones tisulares generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen la concentración de calcio, fósforo, triglicéridos en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para ciertas medidas en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, no obstante, el ayuno desde la víspera puede inferir con el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra en los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Si se opta por el ayuno desde la víspera, las determinaciones de bioquímica clínica deben realizarse después de las observaciones funcionales del estudio.

▼B

Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

Si los datos disponibles sobre antecedentes no son adecuados, debe plantearse la determinación de variables hematológicas y bioquímicas clínicas antes de iniciar la administración de la sustancia; por lo general, se desaconseja obtener dichos datos antes del tratamiento (7).

1.5.2.3. *Autopsia macroscópica*

Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidí-dimos, útero, ovarios, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal (cervical, torácica media y lumbar), hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivares, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, páncreas, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador, seguido de inmersión), aorta, gónadas, útero, órganos sexuales secundarios, glándula mamaria de las hembras, próstata, vejiga urinaria, vesícula biliar (ratón), ganglios linfáticos (preferentemente un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, una sección de la médula ósea (y/o médula ósea aspirada y recién montada), piel y ojos (si se han observado cambios durante los exámenes oftalmológicos). Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

1.5.2.4. *Examen histopatológico*

Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de todos los demás lotes tratados.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

▼B

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas,

— identificación química,

— vehículo (si procede): justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— especie y cepa empleada,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

2.2.4. **Resultados:**

— peso corporal y cambios en el mismo,

— consumo de alimentos y de agua, en su caso,

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad,

▼B

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no),

— resultados del examen oftalmológico,

— evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz (si procede),

— pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia,

— pruebas de bioquímica clínica con los correspondientes valores de referencia,

— peso corporal y peso de los órganos en el momento del sacrificio, y relación peso órgano/peso corporal,

— hallazgos de la autopsia,

— descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas,

— datos sobre la absorción, si los hay,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

3. **REFERENCIAS**

(1) IPCS (1986). Principies and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace. R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, .M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Foreand Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.

▼B

B.27. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN NO ROEDORES

1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad oral subcrónica reproduce las directrices del documento OCDE TG 409 (1998).

1.1. INTRODUCCIÓN

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período de crecimiento rápido hasta el principio de la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana.

El presente ensayo pone de manifiesto los efectos adversos, en animales no roedores, de la exposición a sustancias químicas y está indicado solo en los casos siguientes:

— cuando los efectos observados en otros estudios indiquen la necesidad de aclarar y precisar algunos aspectos en una especie no roedora, o

— cuando los estudios toxicocinéticos indiquen que los animales de experimentación idóneos han de pertenecer a una especie determinada no roedora, o

— cuando haya otros motivos concretos para emplear una especie no roedora.

Véase también la introducción general de la Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

Posología: término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante 90 días. A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo, así como a los que sobrevivan al final del mismo.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

Suele emplearse el perro, preferiblemente de una raza definida. Con frecuencia se utiliza el sabueso. También pueden emplearse otras especies como el cerdo o el cerdo enano. No se recomiendan los primates; su uso ha de justificarse. Deben emplearse animales jóvenes y sanos y, en el caso del perro, la administración de sustancia de ensayo debe comenzar preferiblemente a la edad de 4-6 meses, pero nunca después de los 9 meses. Si el ensayo se realiza como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales de la misma especie y raza.

1.4.2. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales jóvenes y sanos, que se hayan mantenido en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. La duración de la aclimatación dependerá de la especie de ensayo seleccionada y de su procedencia: se recomienda un mínimo de 5 días para los perros y los cerdos criados con ese propósito en un animalario del laboratorio, y de dos semanas si proceden de una fuente exterior. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Estos se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se ponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto.

1.4.3. **Preparación de las dosis**

La sustancia de ensayo se administra con el alimento o el agua de bebida, por sonda o en cápsulas. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicoló-gicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en las condiciones de administración.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

Deben utilizarse por lo menos 8 animales (4 hembras y 4 machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. El número de animales vivos al término del estudio debe permitir una evaluación significativa de los efectos tóxicos. Sobre la base de los conocimientos previos relativos a la sustancia química u otra sustancia muy próxima, puede tratarse un lote satélite de 8 animales (4 de cada sexo) en el control y con la dosis más elevada para observar la reversibilidad o persistencia de efectos tóxicos una vez finalizado el tratamiento. La duración del período de observación posterior al tratamiento ha de establecerse adecuadamente en función de los efectos observados.

▼B

1.5.2. **Posología**

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 1.5.3). Para establecer las dosis pueden emplearse los resultados de los estudios de administración continuada o de determinación de dosis y debe tomarse en consideración toda la información toxi-cológica y toxicocinética disponible sobre la sustancia de ensayo o productos afines. A menos que las características fisicoquímicas o los efectos biológicos de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis. La dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 6-10) entre dosis.

El lote de control no recibe la sustancia de ensayo, pero sí recibe el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se emplea un vehículo, el lote de control ha de recibir el mayor volumen utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para saber si la disminución se debe a las características organolépticas o a alteraciones toxicológicas del modelo de ensayo.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

1.5.3. **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5.4. **Administración de las dosis**

Las dosis de ensayo se administran diariamente a los animales durante 90 días. Cualquier otra posología, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. Por lo general, el volumen ha de ser el mínimo posible. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

▼B

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda o en cápsulas, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de 90 días como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos.

1.5.5. **Observaciones**

El período de observación debe durar al menos 90 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite para las observaciones de seguimiento durante un período adecuado y sin tratamiento, a fin de detectar la persistencia o la desaparición de los efectos tóxicos.

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales. Se examinan todos los animales al menos dos veces al día, por lo general a primera y a última hora, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

Todos los animales deben someterse al menos a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse, si es posible, fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y de preferencia siempre a la misma hora. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos de toxicidad han de anotarse cuidadosamente, así como el momento de aparición, la gravedad y la duración. Las observaciones deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos.

Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, a ser posible, de todos los animales, pero al menos en el lote con la dosis más alta y en el lote de control. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás.

1.5.5.1. *Peso corporal y consumo de alimentos y agua*

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales, medirse el consumo de alimentos y, si la sustancia de ensayo se administra con el agua de bebida, también el consumo de agua. Este último puede vigilarse, asimismo, en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra con los alimentos o mediante sonda y la ingestión de agua pueda verse alterada.

▼B

1.5.5.2. *Hematología y bioquímica clínica*

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado y conservarse, si procede, en condiciones adecuadas. Al final del período de ensayo, las muestras se toman justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio.

Al principio del ensayo y, a continuación, bien una vez al mes bien a la mitad del período de ensayo, así como al término del mismo, debe practicarse un examen hematológico) que incluya hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida de la capacidad de coagulación como el tiempo de coagulación, de protrombina o de trom-boplastina.

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y especialmente en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales al principio del ensayo y, a continuación, bien una vez al mes bien a la mitad del período de ensayo, así como al término del mismo. Debe estudiarse el equilibrio electrolítico, el metabolismo glucídico y las funciones hepática y renal. La elección de determinados análisis dependerá de las observaciones sobre el modo de actuación de la sustancia de ensayo. Los animales deben estar en ayunas antes de las tomas de sangre, durante un período adecuado según la especie. Se propone determinar el calcio, fósforo, cloro, sodio, potasio, glucosa en ayunas, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, ornitina descarboxilasa, gamma-gluta-mil transpeptidasa, nitrógeno residual, albúmina, creatinina en sangre, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Deben practicarse análisis de orina, como mínimo, al inicio, a la mitad y al final del ensayo, utilizando la recogida programada, con el fin de estudiar los parámetros siguientes: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores de lesiones tisulares generales. Para realizar una evaluación toxicológica adecuada pueden ser necesarias otras determinaciones como el análisis de los lípidos, hormonas, equilibrio ácido-básico, metahemoglobina e inhibición de la colinesterasa. Si es preciso, pueden realizarse análisis de bioquímica clínica adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

1.5.5.3. *Autopsia macroscópica*

Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado y la vesícula biliar, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimos, ovarios, útero, glándulas tiroides y paratiroides, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

▼B

Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal (cervical, torácica media y lumbar), hipófisis, ojos, tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivares, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, vesícula biliar, páncreas, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones, aorta, gónadas, útero, órganos sexuales secundarios, glándula mamaria de las hembras, próstata, vejiga urinaria, ganglios linfáticos (de preferencia un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, una sección de la médula ósea (y/o médula ósea aspirada y recién montada) y piel. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

1.5.5.4. *Examen histopatológico*

Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados, al menos, de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, este examen se ampliará a animales de todos los demás lotes tratados.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

2. RESULTADOS E INFORME

2.1. RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

▼B

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas,

— identificación química,

— vehículo (si procede): justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— especie y cepa empleada,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

2.2.4. **Resultados:**

— peso corporal y cambios en el mismo,

— consumo de alimentos y de agua, en su caso,

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad,

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no),

— examen oftalmológico,

— pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia,

— pruebas de bioquímica clínica con los correspondientes valores de referencia,

— peso corporal y peso de los órganos en el momento del sacrificio, y relación peso órgano/peso corporal,

— hallazgos de la autopsia,

— descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas,

— datos sobre la absorción, si los hay,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

▼B

B.28. **TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se aplican a diario dosis crecientes de la sustancia estudiada en la piel de animales de experimentación integrados en varios grupos, a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Antes de proceder a la aplicación, se elimina el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Puede emplearse afeitado, pero deberá practicarse aproximadamente 24 horas antes de la prueba. Suelen ser necesarios cortes o afeitados reiterados del pelo, más o menos a intervalos semanales. Al practicarlos, hay que cuidar de no lesionar la piel. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia en estudio, una superficie no inferior al 10 % de la corporal. Para decidir la zona que debe despejarse y las dimensiones de la superficie a tratar, se tendrá en cuenta el peso del animal. Cuando se prueben sólidos, que pueden pulverizarse si se considera oportuno, se humedecerá lo suficiente la sustancia estudiada con agua o, en caso necesario, un vehículo apropiado para garantizar un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se emplean por lo general sin diluir. Se practican aplicaciones diarias 5 o 7 días a la semana.

Condiciones del ensayo

Animales de experimentación

Pueden emplearse ratas, conejos o cobayas adultos. Es posible emplear otras especies, pero su uso exigiría justificación. Al principio de la prueba, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al ± 20 % del peso medio. Cuando se realice una prueba dérmica subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie y cepa.

▼B

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) con piel sana para cada dosis. Las hembras serán nulíparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos y un control, o un control para el vehículo si se emplea este. El período de exposición no será inferior a 6 horas diarias. La aplicación de la sustancia de prueba debe hacerse a las mismas horas todos los días, y la cantidad del producto se ajustará a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantenga una dosis constante en relación con el peso del animal. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, el grupo de control lo recibirá de igual modo que los grupos tratados, y en cantidad igual a la administrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a ese valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Si la aplicación de la sustancia probada provoca una irritación cutánea grave, se reducirán las concentraciones, lo que quizá origine una reducción, o la ausencia, de otros efectos tóxicos con la dosis alta. Si la piel ha sufrido lesiones importantes, quizá sea necesario dar por concluido el estudio y emprender uno nuevo a concentraciones menores.

Prueba de límite

Si una experiencia previa realizada con una dosis de 1 000 mg/kg, o superior, en función de la posibilidad de exposición humana (siempre que esta se conozca) no ha provocado efecto tóxico alguno, cabe considerar inútil la continuación de la experiencia.

Período de observación

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y del de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

▼B

Procedimiento

Los animales se alojarán en jaulas individuales. El régimen ideal comprende la administración, a los animales, de la sustancia ensayada los 7 días de la semana durante un período de 90 días.

Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben observarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. El período de exposición diario será de 6 horas.

La sustancia estudiada se aplicará uniformemente sobre una zona que corresponda aproximadamente al 10 % de la superficie corporal total. En caso de sustancias muy tóxicas, la zona tratada puede ser inferior, pero se cubrirá con una capa lo más uniforme y delgada posible.

Durante la exposición, la sustancia estudiada se mantiene en contacto con la piel con ayuda de un apósito de gasa poroso y esparadrapo no irritante. Además, la zona tratada se cubrirá de forma que se mantengan colocados el apósito y la sustancia y se impida a los animales la ingestión de esta. Cabe utilizar dispositivos de sujeción para evitar la ingestión de la sustancia objeto de estudio, pero no se recomienda la inmovilización completa.

Al final del período de exposición, se eliminará la sustancia restante, siempre que sea posible, por medio de agua o algún otro método apropiado de limpieza de la piel.

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales. Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes de los grupos de tratamiento no satélites. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.

▼B

c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica ([1]) y gluamicooxaloacética ([2]) séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.

d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro —incluidos cortes de bulbo/protuberancia—, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales accesorios, vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), (esternón con médula ósea), (fémur, incluida superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis solo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

a) Se someterán a un examen histopatológico completo la piel normal y la tratada, y los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y los de dosis máxima.

b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.

([1]) Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
([2]) Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

▼B

c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.

d) Si se utilizan ratas, se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico en busca de signos de infección, ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.

e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación,

— condiciones de la prueba,

— dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones,

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis,

— dosis carente de efectos, si es posible,

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia,

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo,

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de este,

— datos sobre alimentación y peso,

— hallazgos oftalmológicos,

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos,

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede),

— hallazgos de autopsia,

▼B

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos,

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼M4

B.29. TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 90 DÍAS

RESUMEN

El presente método de ensayo B.29 se ha diseñado para caracterizar debidamente la toxicidad por inhalación de una sustancia química después de una exposición subcrónica (90 días de duración), y para recabar datos robustos que permitan hacer una evaluación cuantitativa del riesgo por inhalación. Se forman lotes de al menos 10 roedores machos y 10 hembras y se exponen 6 horas al día durante un período de 90 días (13 semanas) a: a) la sustancia problema a tres o más niveles de concentración; b) aire filtrado (testigo negativo), y/o c) el vehículo (testigo del vehículo). Habitualmente los animales se exponen 5 días por semana, aunque se acepta una pauta de 7 días por semana. Se estudian siempre animales machos y hembras, pero pueden exponerse a diferentes niveles de concentración si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema. Este método concede al director del estudio suficiente flexibilidad para incluir lotes satélite (reversibilidad), sacrificios durante el ensayo, lavados broncoalveolares (BAL), pruebas neurológicas y otras evaluaciones de patología clínica y de histopatología orientadas a caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema.

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 413 de la OCDE (2009). Las directrices originales sobre ensayos de toxicidad subcrónica por inhalación (TG 413) fueron adoptadas en 1981 (1). El presente método de ensayo B.29 [equivalente a las TG 413 (2009) revisadas] se ha actualizado para reflejar el estado actual de la ciencia y satisfacer las necesidades normativas actuales y futuras.

2. Los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación sirven fundamentalmente para establecer las concentraciones normativas que permitan evaluar el riesgo de los trabajadores en el entorno laboral. Permiten además evaluar el riesgo en la vivienda humana, el transporte y el medio ambiente. Este método permite caracterizar los efectos adversos que se producen después de la exposición por inhalación diaria continuada de una sustancia problema durante 90 días (aproximadamente el 10 % de la vida de la rata). A partir de los datos derivados de los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación, se pueden hacer evaluaciones cuantitativas del riesgo y seleccionar las concentraciones aplicables a los estudios de toxicidad crónica. El presente método de ensayo no está específicamente destinado a la investigación de nanomateriales. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 39 (2).

CONSIDERACIONES INICIALES

3. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema. En la selección de las concentraciones idóneas de estudio resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro,* uso(s) previsto(s) y posible exposición humana, datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de compuestos químicos estructuralmente afines, y resultados obtenidos en otros estudios de exposición continuada. Si se prevé o se observa neurotoxicidad en el transcurso del estudio, el director del mismo puede decidir la incorporación de las evaluaciones pertinentes, como una batería de observación funcional (FOB) y registros de la actividad motriz. Si bien el calendario de las exposiciones en relación con las evaluaciones concretas puede ser crítico, la realización de estas actividades complementarias no debe interferir en el diseño básico del estudio.

▼M4

4. Las diluciones de sustancias problema corrosivas o irritantes se pueden estudiar a concentraciones capaces de inducir el grado de toxicidad esperado. Se ofrece más información en el documento de orientación nº 39 (2). Al exponer los animales a estos productos, las concentraciones diana deben ser lo bastante bajas para no provocar un dolor y sufrimiento intensos, pero suficientes para obtener una curva de concentración-respuesta que satisfaga los objetivos científicos y normativos del ensayo. Dichas concentraciones se escogerán según cada caso, preferiblemente sobre la base de estudios del intervalo analítico debidamente diseñados que arrojen información sobre el parámetro crítico principal, el eventual umbral de irritación y el tiempo de aparición de los síntomas (véanse los puntos 11-13). Se justificará la elección de las concentraciones.

5. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales moribundos se contabilizan como muertes durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

6. Hay que utilizar roedores adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie preferida es la rata. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

Preparación de los animales

7. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la asignación aleatoria, los animales serán adultos jóvenes de entre 7 y 9 semanas de edad. Los pesos corporales se desviarán a lo sumo ± 20 % del peso medio de cada sexo. Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar el ensayo, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

Zootecnia

8. Los animales se identificarán de manera individual, preferiblemente con transpondedores subcutáneos, a fin de facilitar la observación y evitar confusiones. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por lotes de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. La iluminación será artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

▼M4

Cámaras de inhalación

9. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzan mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento de orientación nº 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Concentraciones límite

10. A diferencia de los estudios de toxicidad aguda, en los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación no hay concentraciones límite definidas. La concentración máxima estudiada dependerá de: 1) la máxima concentración alcanzable, 2) el nivel de exposición humana en el caso más desfavorable, 3) la necesidad de mantener un suministro de oxígeno adecuado, y/o 4) la atención al bienestar de los animales. Si no se dispone de datos de concentración límite, es aplicable el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (13) [hasta una concentración máxima de 5 mg/l para los aerosoles, de 20 mg/l para los vapores y de 20 000 ppm para los gases; véase el documento GD 39 (2)]. Cuando sea preciso superar estos límites en el estudio de gases o sustancias altamente volátiles (por ejemplo, refrigerantes), habrá que justificar los motivos. La concentración límite será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

Estudio de determinación del intervalo

11. Antes de proceder al estudio principal, generalmente es necesario realizar un estudio para determinar el intervalo analítico. Un estudio de determinación del intervalo es más completo que un estudio preliminar, por cuanto no se limita a la selección de las concentraciones. La información recabada en este tipo de estudio puede ser decisiva para el éxito del estudio principal. Un estudio de determinación del intervalo puede, por ejemplo, aportar información técnica referente a los métodos analíticos y al tamaño de partícula, la detección de los mecanismos de toxicidad, los datos de patología clínica y de histopatología, y las estimaciones de lo que podrán ser el NOAEL y la concentración tóxica mínima en un estudio principal. El director de la investigación decidirá si basarse en el estudio de determinación del intervalo para identificar el umbral de irritación de las vías respiratorias (con la histopatología de las vías respiratorias, las pruebas de la función pulmonar o el lavado broncoalveolar), la concentración máxima tolerada sin causar un sufrimiento indebido a los animales y los parámetros que caractericen mejor la toxicidad de la sustancia problema.

12. Un estudio de determinación del intervalo puede hacerse con uno o más niveles de concentración. Dependiendo de los parámetros elegidos, a cada nivel de concentración se expondrán de tres a seis machos y de tres a seis hembras. El estudio de determinación del intervalo tendrá una duración mínima de 5 días y máxima (generalmente) de 28 días. En el informe del estudio se justificará la selección de las concentraciones destinadas al estudio principal. La finalidad del estudio principal es demostrar una relación concentración-respuesta basada en lo que se prevé como el parámetro más sensible. La concentración más baja será idealmente una en la que no se observen efectos adversos, mientras que la concentración más alta será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

▼M4

13. A la hora de elegir los niveles de concentración para el estudio de determinación del intervalo, se tendrá en cuenta toda la información disponible, incluidos las relaciones entre estructura y actividad y los datos de sustancias afines (véase el punto 3). Un estudio de determinación del intervalo puede verificar o refutar los parámetros relacionados con los mecanismos de acción que *a priori* se consideran más sensibles, como la inhibición de la colinesterasa por los organofosforados, la formación de metahemoglobina por agentes eritrotóxicos, las hormonas tiroideas (T_3 y T_4), en el caso de tirotóxicos, y la presencia de proteínas, LDH o neutrófilos en el lavado broncoalveolar en el caso de partículas inocuas escasamente solubles o de aerosoles que son irritantes pulmonares.

Estudio principal

14. El estudio principal de toxicidad subcrónica comprende habitualmente tres niveles de concentración, además de lotes de control negativo (aire) y/o testigo del vehículo (véase el punto 18). Se recurrirá a todos los datos disponibles para basar la selección de los niveles de exposición adecuados, incluidos los resultados de los estudios de toxicidad sistémica, metabólicos y cinéticos (poniendo especial atención para evitar niveles de concentración elevados que saturen los procesos cinéticos). Cada lote de ensayo se compone de 10 roedores machos y de 10 hembras, que se exponen a la sustancia química 6 horas al día en un régimen de 5 días por semana durante un período de 13 semanas (la duración total del estudio es de 90 días como mínimo). También se admite exponer a los animales 7 días por semana (por ejemplo, cuando se estudian productos farmacéuticos para inhalación). Si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema, podrán exponerse los dos sexos a diferentes niveles de concentración con el fin de optimizar la relación concentración-respuesta, tal como se describe en el punto 15. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificarán los motivos cuando el tiempo de exposición sea inferior a 6 horas/día o cuando sea necesario efectuar un estudio de exposición de cuerpo entero de larga duración (por ejemplo, 22 horas/día) [véase el documento GD 39 (2)]. Se privará de comida a los animales durante el período de exposición, a menos que este exceda de 6 horas. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

15. Las concentraciones diana seleccionadas deben servir para identificar el órgano o los órganos diana y para demostrar una clara relación concentración-respuesta.

— El nivel de concentración más elevado debe inducir efectos tóxicos, pero sin provocar letalidad o daños persistentes que impidan hacer una evaluación significativa.

— El nivel o los niveles de concentración intermedios se espaciarán para obtener una graduación o escala de los efectos tóxicos desde el nivel más bajo al más elevado.

— La concentración más baja debe producir escasos o nulos signos de toxicidad.

Sacrificios durante el estudio

16. Si se proyecta hacer sacrificios durante la investigación, el número de animales incluido en cada nivel de exposición se incrementará en el número que vaya a ser sacrificado antes de que concluya el estudio. Se justificará la necesidad de hacer tales sacrificios, que se computarán oportunamente en los análisis estadísticos.

▼M4

Estudio satélite (de reversibilidad)

17. Es posible recurrir a un estudio satélite (de reversibilidad) para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de toxicidad durante un período de duración adecuada, pero nunca inferior a 14 días, después del tratamiento. Los lotes satélite (de reversibilidad) se componen de 10 machos y 10 hembras, que se exponen simultáneamente a los animales de experimentación del estudio principal. Los lotes del estudio satélite (de reversibilidad) deben exponerse a la sustancia problema al nivel de concentración más elevado y, en la medida necesaria, se emplearán simultáneamente lotes de control con aire y/o con el vehículo (véase el punto 18).

Animales de control

18. Los animales de control negativo (con aire) en paralelo se tratan de manera idéntica a los animales del lote experimental, excepto en que se exponen al aire filtrado en lugar de a la sustancia problema. Cuando se utiliza agua o cualquier otra sustancia para ayudar a crear la atmósfera experimental, en el estudio debe incluirse un lote testigo del vehículo, en lugar del lote de control negativo (con aire). Como vehículo se usará agua en la medida de lo posible. Cuando se use agua como vehículo, los animales de control se expondrán a una atmósfera de aire con la misma humedad relativa que los grupos expuestos a la sustancia problema. La selección de un vehículo idóneo se basará en un ensayo preliminar debidamente realizado o bien en los datos previos. Cuando no se conoce bien la toxicidad de un vehículo, el director del estudio puede decidir el uso de ambos grupos, el de control negativo (con aire) y el testigo del vehículo, pero no es en absoluto recomendable. Si los datos previos revelan que un vehículo es atóxico, no hay necesidad de emplear un grupo de control negativo (con aire), y solo se usará un lote testigo del vehículo. Si un ensayo preliminar de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada y es el que debe utilizarse como control.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

19. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico investigado dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de las concentraciones seleccionadas y/o de la forma física más probable que adoptará la sustancia química durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas. Las materias particuladas pueden someterse a procesos mecánicos para reducir el tamaño de partícula. Se ofrecen más orientaciones en el documento de orientación nº 39 (2).

Distribución granulométrica

20. Se controlará el tamaño de partícula en todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 3 μm, con una desviación típica geométrica (σ_g) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (4). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Así, por ejemplo, las partículas de los humos metálicos tienen un tamaño inferior al mencionado intervalo, mientras que las partículas con carga y las fibras pueden superarlo.

▼M4

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

21. En condiciones ideales, la sustancia problema debería estudiarse sin ningún vehículo. Si es necesario emplear un vehículo para generar una concentración de sustancia problema y un tamaño de partícula adecuados, se le dará preferencia al agua. Siempre que una sustancia problema se disuelva en un vehículo, debe demostrarse su estabilidad.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

22. El caudal de aire de la cámara de exposición se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión en tiempo real de la concentración atmosférica (o la estabilidad temporal) del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de la inhalación que resultan de interés. Si la concentración se supervisa en tiempo real, es posible reducir la frecuencia de medición del caudal de aire limitándola a una sola medición por exposición y día. Habrá que tomar especiales precauciones para evitar la reinspiración en las cámaras de solo por la nariz. La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a conseguir estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases. Si las mediciones del primer día de exposición revelan que estos gases están presentes a las concentraciones adecuadas, no serán necesarias nuevas determinaciones.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

23. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. Siempre que sea posible, la humedad relativa presente en la zona de respiración de los animales, tanto en las exposiciones de solo por la nariz como de cuerpo entero, se supervisará de manera continua y se registrará cada hora durante la exposición. La humedad relativa debe mantenerse preferiblemente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia con el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

24. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara de inhalación. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

Sustancia problema: concentración real

25. La concentración real es la concentración de sustancia problema comprobada por muestreo en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también

▼M4

por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trata de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases.

26. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema a lo largo de todo el estudio, lote que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

27. La atmósfera de exposición debe mantenerse constante en la medida de lo posible. Para demostrar la estabilidad de las condiciones de exposición se puede usar un equipo de supervisión en tiempo real, como un fotómetro de proceso para aerosoles o un analizador de hidrocarburos totales para análisis de vapores. La concentración real presente en la cámara deberá medirse al menos 3 veces por cada nivel y día de exposición. Pero si ello no es posible debido a un caudal de aire limitado o a que las concentraciones son bajas, se acepta una muestra por período de exposición. En ese caso, lo ideal es recoger la muestra durante todo el período de exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en más de un ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, ni en más de un ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y documentará el tiempo de equilibrado (t_{95}) de la cámara. La duración de una exposición incluye el tiempo durante el cual se genera la sustancia problema. Este abarca los tiempos transcurridos hasta alcanzar el equilibrio en la cámara (t_{95}) y hasta la extinción. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} en el documento de orientación nº 39 (2).

28. Cuando se manejan mezclas muy complejas formadas por gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación. Por consiguiente, se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente el componente activo principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o el componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (2).

Sustancia problema: distribución granulométrica

29. La distribución granulométrica de los aerosoles debe determinarse al menos con periodicidad semanal por cada nivel de concentración, con ayuda de un impactador de cascada o un aparato alternativo, como un medidor del tamaño aerodinámico de partícula (APS). Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio.

▼M4

30. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia para todas las concentraciones analizadas en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir el ensayo.

31. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases.

OBSERVACIONES

32. Los animales se someterán a observación clínica frecuente antes, durante y después del período de exposición. Pueden estar indicadas observaciones más frecuentes, dependiendo de la respuesta de los animales durante la exposición. Cuando la observación de los animales esté dificultada por el uso de tubos de sujeción, por la escasa iluminación de las cámaras de cuerpo entero o por la opacidad ambiental, se someterán a observación minuciosa después de la exposición. Las observaciones realizadas con anterioridad a la exposición del día siguiente permiten determinar la posible reversibilidad o exacerbación de los efectos tóxicos.

33. Todas las observaciones se registrarán en fichas individuales de cada animal. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

34. Las observaciones fuera de la jaula deberían incluir los cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas; los cambios en los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento. En el protocolo del estudio se pueden incluir otras evaluaciones del tipo de pruebas cinéticas, biovigilancia, pruebas de la función pulmonar, retención de materiales escasamente solubles que puedan acumularse en el tejido pulmonar y cambios comportamentales.

PESO CORPORAL

35. Se registrará el peso de cada animal poco antes de la primera exposición (día 0), y después dos veces por semana (por ejemplo, los viernes y lunes para demostrar la recuperación durante un fin de semana sin exposición, o con un intervalo que permita evaluar la toxicidad sistémica) y en el momento de la muerte o la eutanasia. Si no se observan efectos en las 4 primeras semanas, el peso corporal se podrá registrar semanalmente durante el resto del estudio. Si se utilizan animales satélite (reversibilidad), se seguirán pesando semanalmente durante todo el período de recuperación. Al concluir el estudio, se pesarán todos los animales poco antes del sacrificio para permitir calcular sin sesgos la relación entre el peso de los órganos y el peso corporal.

CONSUMO DE AGUA Y DE ALIMENTOS

36. El consumo alimentario se medirá cada semana. También se puede medir el consumo de agua.

▼M4

PATOLOGÍA CLÍNICA

37. Deben hacerse evaluaciones de patología clínica en todos los animales, incluidos los testigo y los satélite (reversibilidad), cuando sean sacrificados. Se registrará el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la exposición y la toma de muestras de sangre, particularmente si la recuperación del parámetro valorado es rápida. Está indicado obtener muestras al final del período de exposición cuando se trata de parámetros con una semivida plasmática corta (por ejemplo, COHb, CHE y MetHb).

38. En el cuadro 1 se recogen los parámetros de patología clínica que se suelen exigir en todos los estudios toxicológicos. El análisis de orina no es necesario hacerlo de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos. El director del estudio puede decidir la evaluación de otros parámetros para caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema (colinesterasa, lípidos, hormonas, equilibrio ácido-base, metahemoglobina o cuerpos de Heinz, creatina-cinasa, cociente mieloide/eritroide, troponinas, gases en sangre arterial, lactato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa y gamma-glutamil-transpeptidasa).

Cuadro 1

Parámetros de patología clínica habituales

Hematología	
Recuento de eritrocitos	Recuento de leucocitos
Hematocrito	Fórmula leucocitaria
Concentración de hemoglobina	Recuento de plaquetas
Hemoglobina corpuscular media	Capacidad de coagulación (seleccionar una):
Volumen corpuscular medio	— Tiempo de protrombina
Concentración de hemoglobina corpuscular media	— Tiempo de coagulación
Reticulocitos	— Tiempo de tromboplastina parcial
Bioquímica clínica	
Glucosa (*)	Alanina-aminotransferasa
Colesterol total	Aspartato-aminotransferasa
Triglicéridos	Fosfatasa alcalina
Nitrógeno ureico en sangre	Potasio
Bilirrubina total	Sodio
Creatinina	Calcio
Proteínas totales	Fósforo
Albúmina	Cloruros
Globulinas	
Análisis de orina (opcional)	
Aspecto (color y turbidez)	Proteínas totales
Volumen	Glucosa
Densidad y osmolalidad	Sangre/células sanguíneas
pH	

(*) Puesto que un período de ayuno prolongado puede introducir un sesgo en las determinaciones de glucosa entre los animales testigo y los tratados, el director del estudio decidirá si es apropiado o no imponer dicho ayuno a los animales. Si se impone un período de ayuno, será acorde a la especie empleada; para las ratas puede ser de 16 horas (ayuno desde la víspera). La determinación de la glucosa en ayunas puede hacerse previo ayuno desde la víspera durante la última semana de exposición, o bien previo ayuno desde la víspera antes de proceder a la autopsia (en este último caso, con la determinación de los restantes parámetros de patología clínica).

▼M4

39. Cuando hay indicios de que las vías respiratorias bajas (alvéolos) son el lugar principal de depósito y retención, el lavado broncoalveolar (BAL) puede ser la técnica de elección para analizar cuantitativamente los parámetros hipotéticamente dependientes de la dosis relacionados con la aparición de alveolitis, inflamación pulmonar y fosfolipidosis. Ello permite demostrar debidamente la relación dosis-respuesta y la evolución en el tiempo del daño alveolar. En el fluido BAL se pueden analizar el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, las proteínas totales y la lactato-deshidrogenasa. Otros parámetros dignos de tenerse en cuenta son los indicadores de daño lisosomal, fosfolipidosis, fibrosis e inflamación alérgica o irritativa, como puede ser la determinación de las citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Generalmente, las determinaciones realizadas en el BAL son complementarias de los resultados del examen histopatológico, pero no pueden sustituirlos. En el documento GD 39 (2) se facilitan indicaciones sobre el modo de realizar un lavado pulmonar.

EXAMEN OFTALMOLÓGICO

40. Con ayuda de un oftalmoscopio o instrumento equivalente, se realizarán exploraciones oftalmológicas del fondo de ojo, los medios refringentes, el iris y la conjuntiva de todos los animales antes de la administración de la sustancia problema, y del grupo sometido a concentración más elevada al concluir el estudio. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales, incluidos los del lote satélite (de reversibilidad).

ANATOMÍA PATOLÓGICA MACROSCÓPICA Y PESO DE LOS ÓRGANOS

41. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Se documentará el tiempo transcurrido entre el final de la última exposición de cada animal y su sacrificio. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de descubrir la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a una temperatura suficientemente baja para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

42. En el cuadro 2 se indican los órganos y tejidos que durante la autopsia macroscópica deben conservarse en un medio idóneo para su examen histopatológico. La conservación de los órganos y tejidos entre corchetes, así como de cualquier otro órgano o tejido, se hará a criterio del director del estudio. Los órganos destacados **en negrita** se deben limpiar de adherencias y pesar lo antes posible después de la disección para evitar su desecación. El tiroides y los epidídimos solo se pesarán en caso necesario, porque los artefactos debidos a las adherencias pueden dificultar la evaluación histopatológica. Los tejidos y órganos se fijan en formol con amortiguador al 10 % o en otro fijador apropiado inmediatamente después de la autopsia, dejando pasar un mínimo de 24-48 horas antes de la limpieza de adherencias, dependiendo del fijador empleado.

▼M4

Cuadro 2

Órganos y tejidos conservados durante la autopsia macroscópica

Cápsulas suprarrenales	Esófago
Aorta	[Bulbo olfativo]
Médula ósea (y/o aspirado reciente)	**Ovarios**
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Páncreas
Intestino ciego	Glándulas paratiroides
Colon	Nervios periféricos (ciático o tibial, preferiblemente próximos al músculo)
Duodeno	Hipófisis
[**Epidídimos**]	Próstata
[Ojos (retina, nervio óptico) y párpados]	Recto
Fémur y articulación tibiofemoral	Glándulas salivales
Vesícula biliar (de estar presente)	Vesículas seminales
[Glándula de Harder]	Piel
Corazón	Médula espinal (cervical, medio-dorsal y lumbar)
Íleo	**Bazo**
Yeyuno	Esternón
Riñones	Estómago
[Glándulas lacrimales (extraorbitarias)]	Dientes
Laringe (3 secciones, incluida la base de la epiglotis)	**Testículos**
Hígado	**Timo**
Pulmón (todos los lóbulos en una sección de corte, incluidos los bronquios primarios)	**Glándula tiroides**
Ganglios linfáticos de la región hiliar del pulmón, especialmente cuando se estudian sustancias problema particuladas escasamente solubles. Si se trata de exámenes más minuciosos o de carácter inmunológico, pueden tomarse en consideración otros ganglios linfáticos, por ejemplo de las regiones mediastínica, cervical/submandibular o auricular.	[Lengua]
	Tráquea (como mínimo 2 secciones, 1 longitudinal que pase por la carina traqueal y 1 sección transversal)
Ganglios linfáticos (distales de la vía de acceso)	[Uréteres]
Glándulas mamarias (femeninas)	[Uretra]
Músculo (muslo)	[Vejiga urinaria]
Tejidos nasofaríngeos [como mínimo 4 secciones; una sección incluirá el conducto nasofaríngeo y el tejido linfoide asociado a la nariz (Nasal Associated Lymphoid Tissue, NALT)]	**Útero**
	Órganos diana
	Todas las masas y lesiones macroscópicas

▼M4

43. El pulmón se debe extraer intacto, pesar e instilar con un fijador apropiado a una presión de 20-30 cm de agua para asegurar el mantenimiento de la estructura pulmonar (5). Se preparan cortes de todos los lóbulos a un solo nivel, incluyendo los bronquios primarios, pero, si se practica un lavado pulmonar, el lóbulo no lavado se seccionará a tres niveles (no en cortes seriados).

44. Deben examinarse como mínimo 4 secciones de los tejidos nasofaríngeos, una de las cuales incluirá el conducto nasofaríngeo (5) (6) (7) (8) (9) para permitir una observación adecuada de los epitelios escamoso, transicional (respiratorio no ciliado) y olfativo, y el tejido de drenaje linfático (NALT) (10) (11). Se examinarán tres secciones de la laringe, una de las cuales debe incluir la base de la epiglotis (12). Deben examinarse como mínimo 2 secciones de la tráquea, entre ellas un corte longitudinal que pase por la carina de bifurcación de los bronquios extrapulmonares y un corte transversal.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

45. La evaluación histopatológica de todos los órganos y tejidos mencionados en el cuadro 2 se llevará a cabo en el lote de control y en el de concentración más elevada, así como en todos los animales que mueran o sean sacrificados durante el estudio. Se prestará especial atención a las vías respiratorias, los órganos diana y las lesiones macroscópicas. Aquellos órganos y tejidos que presenten lesiones en el lote de concentración más elevada se examinarán en todos los grupos. Con objeto de demostrar una clara relación concentración-respuesta, el director del estudio puede decidir la realización de evaluaciones histopatológicas en otros lotes. Si se utiliza un lote satélite (reversibilidad), debe hacerse un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados. Si en el lote de exposición elevada se producen muertes prematuras u otras dificultades que comprometan la interpretación de los datos, se practicarán evaluaciones histopatológicas en el lote de la concentración inmediatamente inferior. Se procurará correlacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

DATOS E INFORME

Datos

46. Se documentarán los datos de cada animal referentes a peso corporal, consumo de alimento, patología clínica, anatomía patológica macroscópica, peso de los órganos e histopatología. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la autopsia. Todos los resultados, cuantitativos y fortuitos, se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido; los métodos estadísticos aplicados deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

Informe del ensayo

47. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Animales de experimentación y zootecnia

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

▼M4

— Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata. Podrán indicarse la procedencia y los datos previos, siempre que correspondan a animales sometidos a condiciones parecidas de exposición, alojamiento y alimentación.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de asignación al azar.

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación

— Descripción pormenorizada de la cámara de inhalación, incluido el volumen, y acompañada de un diagrama.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Instrumental empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente del aire y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del instrumental para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en la cámara (de cuerpo entero).

— Estabilidad de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Tratamiento del aire suministrado/extraído.

— Caudales de aire, caudal de aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

▼**M4**

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, mg/m^3, etc.) y no en unidades de volumen (ppm, ppmm, etc.).

— Distribución granulométrica, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σ_g), incluidos los correspondientes métodos de cálculo. Se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo

— Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del instrumental empleado para controlar la temperatura, la humedad y el caudal de aire de la cámara (creación de una curva de calibración).

— Descripción pormenorizada del equipo empleado para tomar las muestras con el fin de medir la concentración de la cámara y la distribución por tamaño de partícula.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Método aleatorio de asignación de los animales a los lotes de exposición y de control (testigo).

— Pormenores de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua.

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados

— Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de granulometría, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y σ_g.

— Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).

▼M4

— Tabulación de los pesos de los animales individuales.

— Tabulación del consumo de alimentos.

— Tabulación de los datos de patología clínica.

— Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para satisfacer los criterios del presente método de ensayo como, por ejemplo, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplienlos criterios relativos al tamaño de partícula.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

— Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre parámetros de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3).

— Se identificarán el órgano o los órganos diana.

— Se determinarán los valores de NOAEL y LOAEL.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

B.30. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 452 de la OCDE (2009). Las TG 452 originales fueron adoptadas en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.30 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (1) (2) (3) (4). La actualización de este método de ensayo B.30 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.32. Ensayo de carcinogénesis y B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, con el fin de obtener más información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. El presente método de ensayo ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales.

2. La mayoría de los ensayos de toxicidad crónica se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (5), con las debidas modificaciones, tal como se especifica en el documento de orientación nº 116 de la OCDE sobre diseño y realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (6).

3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de toxicidad crónica son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6).

4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de toxicidad crónica. Si bien los estudios de toxicidad crónica a largo plazo que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, parámetros clínicos e histopatológicos, etc. La OCDE dispone de documentación de orientación sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (6) (7) y por vía cutánea (6). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (7). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (10) del presente anexo.

▼M4

5. Un ensayo de toxicidad crónica proporciona información sobre el peligro para la salud que supone la exposición continuada de la especie estudiada durante una parte considerable de su ciclo vital. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema; indica los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede proporcionar además una estimación del nivel máximo sin efectos adversos observados, que puede ser útil para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.

6. Los objetivos de los estudios realizados según este método de ensayo son:

— la identificación de la toxicidad crónica de una sustancia problema,

— la identificación de los órganos diana,

— la caracterización de la relación dosis-respuesta,

— la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),

— la predicción de los efectos de toxicidad crónica que se producirán a los niveles de exposición humana,

— la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (6).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación de las características toxicológicas de una sustancia problema, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia química antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en la toxicidad crónica potencial y minimizar el uso de animales. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; cualquier información referente al mecanismo de acción; los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo;* el uso o los usos previstos y la exposición humana potencial; los datos de (Q)SAR previos y los datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines; los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La determinación de la toxicidad crónica solo debe emprenderse una vez que se ha recabado la información toxicológica inicial en los ensayos de toxicidad por administración repetida durante 28 días y/o 90 días. Se hará un planteamiento escalonado de los estudios de toxicidad crónica como parte de la evaluación global de los potenciales efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (11) (12) (13) (14).

8. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Una cuestión importante es si la evaluación estadística debe incorporar ajustes de la supervivencia y los análisis en caso de terminación prematura de uno o varios lotes. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y referencias a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (6) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (15).

▼M4

9. Cuando se efectúa un estudio de toxicidad crónica, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de los signos clínicos con criterios compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (16), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o sufrimiento, o reducir la dosis experimental.

10. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (6) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (17) (18). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo o los objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los peligros, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y su importancia, por otro. Ello tiene especial trascendencia cuando se proyecta (punto 11) un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 del presente anexo).

11. Se considerará la posibilidad de efectuar un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (presente método de ensayo B.30) y un ensayo de carcinogénesis (capítulo B.32 de este anexo). El ensayo combinado permite una mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 9 y 20-25) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados.

12. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento GD 116 (6).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

13. La sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas a varios lotes de animales experimentales, normalmente durante un período de 12 meses, si bien este puede reducirse o prolongarse en función de los requisitos normativos (véase el punto 33). Dicho período se ha seleccionado por ser suficientemente largo para permitir que se manifiesten los eventuales efectos de toxicidad acumulativa, pero sin que se confundan con las alteraciones geriátricas. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. La sustancia problema se administra generalmente por vía oral, aunque también se aceptan las vías inhalatoria y cutánea. El diseño del estudio puede contemplar el sacrificio de uno o más animales durante el ensayo, por ejemplo a los 3 y a los 6 meses, y a tal efecto se podrán prever lotes complementarios de animales (véase el punto 19). A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

▼M4

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

14. El presente método de ensayo se destina principalmente a la evaluación de la toxicidad crónica en roedores (véase el punto 2), si bien se acepta que en determinados marcos legislativos puedan hacerse estudios parecidos en especies no roedoras. Se justificará la elección de la especie. El diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica en especies no roedoras, cuando proceda, se basará en los principios que se recogen en el presente método de ensayo y en el capítulo B.27 de este anexo, Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en no roedores (5). Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6).

15. La especie recomendada en este método de ensayo es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. El estudio de toxicidad crónica debe efectuarse en animales de la misma variedad y procedencia que los usados en el estudio o los estudios preliminares de toxicidad de más breve duración. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

Condiciones de alojamiento y alimentación

16. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (19) (20) (21). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Así mismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia problema se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de la sustancia problema y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

Preparación de los animales

17. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los, animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el

▼M4

estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, con el que se marca de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio adecuado.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

18. Se emplearán animales de ambos sexos. Se empleará un número de individuos tal que al concluir el estudio queden suficientes animales en cada grupo para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. Tratándose de roedores, se emplean al menos 20 animales por sexo y lote en cada nivel de dosificación, mientras que en el caso de no roedores se recomienda un mínimo de 4 animales por sexo y lote. En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales en cada grupo de dosificación para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias.

Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela

19. Si está científicamente justificado, se podrán hacer provisiones para el sacrificio de animales (como mínimo 10 por sexo y lote) durante el ensayo, por ejemplo a los 6 meses, a fin de obtener información sobre la progresión de las alteraciones toxicológicas y sobre el mecanismo de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración repetida realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Cabe la posibilidad de incluir lotes satélite para controlar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema; generalmente, se limitan al lote del nivel de dosis más elevado del estudio y al lote testigo. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar su estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (22). Si está previsto el sacrificio de animales durante el ensayo o la inclusión de lotes satélite o centinela, el diseño experimental se incrementará en el número de animales que vaya a ser sacrificado antes de que concluya el estudio. Estos animales se someten generalmente a las mismas observaciones (peso corporal, consumo de agua y alimentos, valoraciones de hematología y bioquímica clínica e investigaciones anatomopatológicas) que los animales observados en la fase de toxicidad crónica del estudio principal, aunque se puede establecer que en los lotes que se sacrifiquen durante el ensayo, se restrinja dicha evaluación a aspectos cruciales como la neurotoxicidad o la inmunotoxicidad.

Grupos de dosis y posología

20. Se ofrecen indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis en el documento de orientación nº 116 (6). Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 27). Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

▼M4

21. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Tomando en consideración los factores que se indican en el punto 22 que sigue, el nivel de dosis más elevado será tal que provoque signos de toxicidad, por ejemplo, manifestada por una merma de la ganancia de peso corporal (aproximadamente el 10 %).

22. Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal. La dosis más elevada no debe exceder de 1 000 mg/kg peso corporal/día (dosis límite, véase el punto 27).

23. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 25). Para establecer las dosis más bajas se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja.

24. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de las características de la sustancia problema y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.

25. Tal como se recoge en el documento de orientación nº 116 (6), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:

— los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la relación dosis-respuesta,

— la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre la dosimetría externa e interna,

— las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,

— aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

— aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,

— los niveles de exposición humana que cabe prever.

▼M4

26. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

27. Si sobre la base de los estudios preliminares es posible prever que, en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Se puede establecer un límite de 1 000 mg/kg peso corporal/día, salvo si la exposición humana previsible indica la necesidad de emplear un nivel de dosis más elevado.

Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema

28. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia química se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio, como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

29. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.

30. Si la sustancia problema se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administra con los alimentos, se puede usar una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.

▼M4

31. En el caso de la administración oral, las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales (siete días por semana), en general por un período de 12 meses (véase también el punto 33), si bien los requisitos normativos pueden imponer una duración mayor. Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (10), durante un período de 12 meses. La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición será habitualmente de 12 meses. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (8).

32. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia problema es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (22). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo gastrointestinal.

Duración del estudio

33. Si bien este método de ensayo ha sido diseñado principalmente como estudio de toxicidad crónica durante 12 meses, su diseño permite aplicarlo a ensayos de duración menor (6 o 9 meses) o mayor (18 o 24 meses), en función de los requisitos normativos particulares o de los mecanismos específicos que se pretenda investigar. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. Concluida la exposición, los lotes satélite incluidos para comprobar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema deben mantenerse sin administración durante un período no inferior a 4 semanas ni superior a un tercio de la duración total del estudio. Se ofrecen más indicaciones, entre otras, sobre la supervivencia en el estudio en el documento de orientación nº 116 (6).

OBSERVACIONES

34. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda.

▼M4

35. Se someterán todos los animales a observación clínica exhaustiva como mínimo antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto), al concluir la primera semana de estudio y, en lo sucesivo, con periodicidad mensual. El protocolo de tales observaciones se organizará con el fin de minimizar las variaciones entre los observadores individuales y entre los distintos lotes experimentales. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (24).

36. Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado a todos los animales antes de administrar la sustancia problema. Al concluir el estudio, el mismo examen se practicará preferiblemente a todos los animales y, obligatoriamente, a los lotes de control y de dosis más elevada. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás. Si el análisis estructural o cualquier otra información indica toxicidad oftálmica, se aumentará la frecuencia de las exploraciones oftalmológicas.

37. Cuando se trate de sustancias para las que estudios previos de toxicidad por administración repetida durante 28 días o 90 días hayan demostrado efectos neurotóxicos, las pruebas de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (24) [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (25) (26) (27)], así como la evaluación de la fuerza prensil (28) y de la actividad motriz (29), podrán hacerse facultativamente antes de iniciar el estudio, a intervalos de 3 meses durante el mismo hasta un máximo de 12 meses inclusive, y a la conclusión del estudio (si dura más de 12 meses). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

38. Cuando los estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días indiquen que la sustancia tiene capacidad inmunotóxica, al concluir el estudio se podrán proseguir las investigaciones de este parámetro.

Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria

39. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán la ingesta de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

▼M4

Hematología y bioquímica clínica

40. En las investigaciones realizadas con roedores, se practicarán exámenes hematológicos como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, siempre los mismos, a los 3, 6 y 12 meses y al concluir el estudio (si dura más de 12 meses). En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales satélite para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias (véase el punto 18). Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras más pequeñas de animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros hematológicos en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia.

41. Se investigarán los siguientes parámetros (30): recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos y de plaquetas, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada. Pueden determinarse además otros parámetros hematológicos como los cuerpos de Heinz, la morfología de otros eritrocitos atípicos o los valores de metahemoglobina, en función de la toxicidad de la sustancia problema. El planteamiento general ha de ser flexible, y adaptado a los efectos observados o esperados de la sustancia problema. Si esta ejerce efectos sobre el sistema hematopoyético, pueden estar indicados recuentos de reticulocitos y una citología de la médula ósea, que no son valoraciones habituales.

42. En los intervalos de tiempo especificados para determinar las variables hematológicas, se realizarán análisis de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos sobre los tejidos y, específicamente, sobre los riñones y el hígado como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, siempre los mismos. En el caso de los ratones, pueden hacer falta animales satélite para efectuar todas las valoraciones necesarias de bioquímica clínica. Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras de menos animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros de bioquímica clínica en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Se recomienda que los animales (a excepción de los ratones) guarden ayuno desde el día anterior a la extracción de las muestras de sangre. Se investigarán los siguientes parámetros (30): glucosa, urea (nitrógeno ureico), creatinina, proteínas totales, albúmina, calcio, sodio, potasio, colesterol total, al menos dos pruebas completas de la función hepatocelular (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa, ácidos biliares totales) (31) y al menos dos pruebas completas de la función hepatobiliar (fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina total, ácidos biliares totales) (31). Cuando proceda y a tenor de la toxicidad de la sustancia problema, pueden hacerse otras valoraciones de bioquímica clínica como las de triglicéridos en ayunas, hormonas específicas y colinesterasa. Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de los efectos observados o esperados con una sustancia química determinada.

▼M4

43. Se practicarán análisis de orina como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, sobre muestras recogidas respetando los mismos intervalos que en los análisis de hematología y bioquímica clínica. Las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los análisis de orina en un estudio previo efectuado durante 90 días con dosis afines. Las recomendaciones hechas por expertos acerca de los estudios de patología clínica incluyen los siguientes parámetros (30): aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas totales y glucosa. Otras valoraciones son cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre oculta. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

44. De manera general, se acepta que es necesario disponer de valores basales de hematología y bioquímica clínica antes de someter a estudio a los perros, pero no en el caso de las especies roedoras (30). Ahora bien, si los datos basales históricos (véase el punto 50) son insuficientes, se considerará la oportunidad de generar estos datos.

Anatomía patológica

Autopsia macroscópica

45. Como norma debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Sin embargo, se puede prever además la realización solo (en lotes satélite o animales sacrificados durante el ensayo) de valoraciones clave específicas, por ejemplo de neurotoxicidad o inmunotoxicidad (véase el punto 19). Estos animales no tienen que someterse a autopsia ni a las consiguientes exploraciones que se describen a continuación. La autopsia de los animales centinela se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio.

46. Se registrará el peso de los órganos de todos los animales, salvo los que quedan excluidos en la última parte del punto 45. Las cápsulas suprarrenales, encéfalo, epidídimo, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, tiroides (que se pesará después de la fijación, con las paratiroides) y útero de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará el peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. En los estudios con ratones, el pesaje de las cápsulas suprarrenales es opcional.

47. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (32) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Glándulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Riñón	Hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitales)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]

▼M4

Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, medio-dorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación tibiofemoral]	[Bulbo olfativo]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se conservarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

48. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (32). Como mínimo, el examen histopatológico debe hacerse sobre:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas,

— los tejidos diana (o los tejidos que presentaban alteraciones relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis máxima) de todos los animales pertenecientes a los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

▼M4

DATOS E INFORME

Datos

49. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

50. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales controles del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines, y haberse generado en los cincos años precedentes al estudio en cuestión.

51. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 8). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

Informe del ensayo

52. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

— Procedencia de la sustancia.

— Número de lote.

— Certificado de análisis químico.

Vehículo (si procede):

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

Animales de ensayo:

— Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.

— Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.

▼M4

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

— Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.

— Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.

— Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.

— Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

— Vía y método de administración de la sustancia problema.

— En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.

— Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.

— Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal):

— Datos de supervivencia.

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.

— Datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad.

— Naturaleza, incidencia (y, si se ha clasificado, gravedad) y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no).

— Examen oftalmológico.

— Pruebas hematológicas.

— Análisis de bioquímica clínica.

— Análisis de orina.

— Resultados de cualesquiera investigaciones de neurotoxicidad o inmunotoxicidad.

— Peso corporal en el momento de la muerte.

— Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).

— Observaciones de la autopsia.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento.

— Datos sobre la absorción, si los hay.

▼M4

Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.

La discusión de los resultados comprende lo siguiente:

— La relación dosis-respuesta.

— Otras informaciones sobre el modo de acción.

— La discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.

— Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.

— Datos sobre controles históricos.

— Relevancia para los seres humanos.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment Nº 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(9) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(10) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼B

B.31. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA EL DESARROLLO PRENATAL

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 414 (2001).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad para el desarrollo tiene por objeto proporcionar información general sobre los efectos de la exposición prenatal en la hembra grávida sometida a ensayo y en el organismo intrauterino en desarrollo; incluye, en particular, la evaluación de los efectos sobre la madre, así como la muerte, anomalías estructurales y alteraciones del crecimiento del feto. Pese a que las deficiencias funcionales constituyen un aspecto importante del crecimiento, no se contemplan en el presente método de ensayo. Pueden investigarse al margen o como complemento de este método en un estudio de neurotoxicidad para el desarrollo. Este último y el estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones pueden emplearse para detectar deficiencias funcionales y otros efectos postnatales.

En algunos casos particulares, puede ser necesario adaptar el protocolo de este ensayo, en función, por ejemplo, de las propiedades fisicoquímicas o toxicológicas de la sustancia de ensayo. La adaptación será aceptable si se dispone de datos científicos convincentes que indiquen que de esa manera el ensayo proporcionará mayor información. En tal caso, esos datos científicos deberán incluirse minuciosamente en el informe del ensayo.

1.2. DEFINICIONES

Toxicología del desarrollo: estudio de los efectos adversos sobre un organismo en desarrollo, que pueden producirse tras la exposición antes de la concepción y durante el desarrollo prenatal y postnatal hasta la maduración sexual. Los principales signos de la toxicidad para el desarrollo son la muerte del organismo, las anomalías estructurales, la alteración del crecimiento y las deficiencias funcionales. Antiguamente, la toxicología del desarrollo solía denominarse teratología.

Efecto adverso: toda alteración respecto a una situación de referencia, relacionada con el tratamiento, que disminuya la capacidad del organismo para sobrevivir, reproducirse o adaptarse al entorno. La toxicología del desarrollo, considerada en su sentido más amplio, incluye todos los efectos que afectan al desarrollo normal del producto de la concepción, antes y después del nacimiento.

Alteración del crecimiento: alteración que afecte al peso o el tamaño del cuerpo o los órganos de la descendencia.

Alteraciones (anomalías): alteraciones estructurales en el desarrollo, que incluyen las malformaciones y las variaciones (28).

Malformación/anomalía grave: cambio estructural que se considere perjudicial (también puede resultar letal) para el animal y, por lo general, infrecuente.

▼B

Variación/anomalía leve: cambio estructural que se considere poco o nada perjudicial para el animal; puede tener carácter transitorio y ser relativamente frecuente en la población de control.

Producto de la concepción: conjunto de los derivados de un óvulo fecundado, en cualquier fase del desarrollo, desde la fecundación hasta el nacimiento, incluidas las membranas extraembrionarias y el embrión o el feto.

Implantación (anidación): fijación del blastocisto en la túnica epitelial del útero, que incluye la penetración por el epitelio uterino y la inserción en el endometrio.

Embrión: primera fase del desarrollo de un organismo, en particular, la fase de desarrollo de un huevo fecundado desde que aparece el eje mayor hasta que quedan representadas las estructuras principales.

Embriotoxicidad: novicidad para la estructura, el desarrollo, el crecimiento y/o la viabilidad normales de un embrión.

Feto: descendencia nonata en el período postembrionario.

Fetotoxicidad: novicidad para la estructura, el desarrollo, el crecimiento y/o la viabilidad normales de un feto.

Aborto: expulsión prematura del útero de los productos de la concepción (embrión o feto no viable).

Resorción: absorción de un producto de la concepción que muere una vez implantado en el útero.

Resorción precoz: signos de implantación sin embrión ni feto reconocible.

Resorción tardía: embrión o feto muerto, que presenta cambios degenerativos externos.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis o grado de exposición más alto al que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Por lo general, se administra la sustancia de ensayo a las hembras grávidas al menos desde la implantación hasta la víspera del sacrificio, que debe llevarse a cabo tan cerca como sea posible de la fecha probable del parto, pero no demasiado tarde, para evitar la pérdida de datos en caso de parto prematuro. El método de ensayo no se refiere únicamente al período de la organogénesis (del 5° al 15° día en los roedores y del 6° al 18° en el conejo), sino que estudia asimismo los efectos a lo largo de toda la gestación, desde la fase previa a la implantación, en su caso, hasta la víspera de la cesárea. Las hembras se sacrifican poco antes de la cesárea. Se estudia el contenido uterino y se examinan los fetos para detectar las anomalías externas visibles y los cambios en los tejidos blandos y el esqueleto.

▼B

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.5.1. **Selección de la especie animal**

Se recomienda realizar el ensayo con la especie más adecuada y utilizar las especies y cepas de laboratorio más comunes en los ensayos de toxicidad para el desarrollo prenatal. El roedor idóneo es la rata y, entre los no roedores, el conejo. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

1.5.2. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3°) en el caso de los roedores y de 18 °C (+ 3°) en el caso de los conejos, y con una humedad relativa mínima del 30 % y preferiblemente inferior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, si bien lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se proporciona una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad.

El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas. Si bien es preferible colocar a los animales apareados en jaulas individuales, también pueden alojarse en grupos reducidos.

1.5.3. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. El peso y la edad de los animales de experimentación debe ser lo más uniforme posible en todos los lotes de ensayo. Deben emplearse hembras adultas jóvenes y nulíparas para cada dosis. Las hembras han de aparearse con machos de la misma especie y cepa y debe evitarse el apareamiento entre animales hermanos. En el caso de los roedores, el día 0 de la gestación es el día en que se observa un tapón vaginal y/o la presencia de semen; en el caso de los conejos, suele ser el día del coito o de la inseminación artificial, si se emplea esta técnica. Las hembras apareadas se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto. Si el apareamiento se efectúa por grupos, los animales de un mismo grupo se repartirán de forma uniforme entre los distintos lotes. Asimismo, las hembras inseminadas por un mismo macho se repartirán de manera uniforme entre los lotes.

1.6. PROCEDIMIENTO

1.6.1. **Número y sexo de los animales**

Cada lote de ensayo y de control deberá estar integrado por una cantidad de hembras que permita practicar la autopsia de unos 20 ejemplares que presenten puntos de implantación. Los lotes de menos de 16 hembras con puntos de implantación pueden resultar inadecuados. La mortalidad materna no invalida necesariamente el estudio, siempre y cuando no supere el 10 % aproximadamente.

▼B

1.6.2. **Preparación de las dosis**

Si se emplea un aditivo u otro vehículo para facilitar la dosificación, deberán tenerse presentes los efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo y retención o excreción de la sustancia de ensayo, los efectos sobre las propiedades químicas de esta que puedan modificar su toxicidad, y los efectos sobre el consumo de alimentos y agua y sobre el estado nutricional de los animales. El vehículo no debe ser tóxico para el desarrollo ni afectar a la reproducción.

1.6.3. **Posología**

Por lo general, la sustancia de ensayo se administra todos los días desde la implantación (por ejemplo, el quinto día después del apareamiento) hasta la víspera del día en que esté prevista la cesárea. Si los estudios preliminares disponibles no señalan un riesgo elevado de pérdidas preimplantatorias, puede administrarse el tratamiento durante todo el período de gestación, desde el apareamiento hasta la víspera de la cesárea. Se sabe que el estrés y la manipulación indebida durante la gestación pueden ocasionar pérdidas prenatales. Con objeto de evitar las pérdidas prenatales independientes del tratamiento, debe evitarse la manipulación innecesaria de las hembras grávidas y el estrés debido a factores externos como el ruido.

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los animales sanos se distribuyen al azar entre el lote de control y los lotes de ensayo. Las dosis han de ser progresivas para obtener una gradación de efectos tóxicos. A menos que las características fisicoquímicas o las propiedades biológicas de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos para el desarrollo y/o en la madre (signos clínicos o disminución del peso corporal), pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Al menos una dosis intermedia debe producir los efectos tóxicos mínimos observables. La dosis mínima no debe resultar tóxica en absoluto para la madre ni para el desarrollo. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis y la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si bien es cierto que se trata de determinar la NOAEL en la madre, los estudios que no permiten determinarla también son aceptables (1).

Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad y la información complementaria relativa al metabolismo y la toxicocinética de la sustancia de ensayo o productos afines. Dicha información servirá asimismo para justificar la pertinencia de la gama de dosis.

Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia de ensayo, pero sí el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. Debe administrarse el mismo volumen de sustancia de ensayo o de vehículo a todos los lotes. Los animales del lote o lotes de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Los lotes de control a los que se administra el vehículo han de recibir el mayor volumen que se haya utilizado (el que se administre al lote tratado con la dosis inferior).

▼B

1.6.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día, administrada por vía oral y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio no se produce ningún efecto tóxico observable en las hembras grávidas ni en la progenie y si, a la luz de los datos disponibles (por ejemplo, sobre sustancias con características estructurales y/o metabólicas similares), no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Según el grado previsto de exposición humana, puede ser preciso administrar una dosis oral superior en el ensayo límite. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo las que determinan y limitan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse (por ejemplo, la aplicación cutánea no debe producir toxicidad local grave).

1.6.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo y el vehículo suelen administrarse mediante intubación oral. Si se opta por otra vía de administración, deberá motivarse y justificarse, y procederse a las modificaciones pertinentes (2) (3) (4). La sustancia de ensayo debe administrarse todos los días a la misma hora más o menos.

Por lo general, la dosis que se administra a cada animal se calcula con arreglo a la última determinación del peso corporal, si bien conviene ser prudente al adaptar la dosis en el último período de la gestación. Debe considerarse la información disponible para seleccionar la dosis de manera que se evite una toxicidad excesiva para la madre. Si, a pesar de todo, se observa una toxicidad excesiva en las madres tratadas, deberán sacrificarse por métodos compasivos. Si varias hembras grávidas presentan signos de toxicidad excesiva, se contemplará la posibilidad de sacrificar todo el lote tratado con esa dosis. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal y no debe superar 1 ml/l00 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/l00 g de peso corporal. En caso de que se emplee aceite de maíz como vehículo, el volumen no debe superar 0,4 ml/l00 g de peso corporal. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

1.6.6. **Observación de las madres**

Las observaciones clínicas y el correspondiente registro deben efectuarse al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales y, en particular, los animales muertos o moribundos, las alteraciones pertinentes del comportamiento y todos los signos de toxicidad manifiesta.

1.6.7. **Peso corporal y consumo de alimentos**

Los animales deben pesarse el día 0 de la gestación o, a más tardar, el día 3 si se trata de animales ya apareados procedentes de un criador externo; a continuación, el primer día de tratamiento, al menos cada 3 días durante el período de administración y, por último, el día del sacrificio.

▼B

Se registra el consumo de alimentos cada 3 días, coincidiendo con los días en que se pesen los animales.

1.6.8. **Autopsia**

Se sacrifican las hembras la víspera del día previsto para al parto. Aquellas que presenten signos de aborto o parto prematuro antes de la fecha en que esté previsto darles muerte serán sacrificadas y sometidas a un examen macroscópico exhaustivo.

Tras el sacrificio o la muerte en el transcurso del estudio, las hembras se someten a un examen macroscópico para detectar cualquier cambio patológico o anomalía estructural. Con objeto de minimizar los sesgos, es preferible efectuar la observación de las madres durante la cesárea y el examen posterior del feto sin conocer la dosis administrada.

1.6.9. **Examen del contenido uterino**

Inmediatamente después del sacrificio o tan pronto como sea posible tras la muerte del animal, se extrae el útero y se comprueba el estado de gravidez. También se examinarán los úteros que no parezcan grávidos (por ejemplo, mediante tinción de sulfuro amónico en el caso de los roedores y tinción de Salewski u otro método adecuado, en el de los conejos) para confirmar la ausencia de gravidez (5).

Se pesan los úteros grávidos con el cuello, salvo los de las hembras que hayan muerto durante el estudio.

Se cuenta el número de cuerpos amarillos en las hembras grávidas.

Se examina el contenido uterino para determinar el número de embriones o fetos muertos y de fetos viables. Es preciso describir el grado de resorción para calcular la fecha aproximada de la muerte del producto de la concepción (véase el apartado 1.2).

1.6.10. **Examen de los fetos**

Se determina el sexo y el peso corporal de cada feto.

Se examinan todos los fetos para ver si presentan alteraciones externas (6).

Se ve, asimismo, si presentan alteraciones del esqueleto o los tejidos blandos (por ejemplo, variaciones y malformaciones o anomalías) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Es aconsejable, pero no indispensable, clasificar las alteraciones fetales. Si se efectúa la clasificación, deben establecerse claramente los criterios que definan cada clase. Se estudiará detenidamente si ha habido alteraciones en el desarrollo del tracto genital.

En el caso de los roedores, se prepara aproximadamente la mitad de cada camada para estudiar las alteraciones del esqueleto. El resto se prepara para el estudio de las alteraciones de los tejidos blandos, que se efectuará en cortes seriados realizados por métodos reconocidos o apropiados o mediante técnicas finas de disección macroscópica.

▼B

Si se han empleado no roedores, por ejemplo conejos, todos los fetos se someten a examen para detectar posibles alteraciones de los tejidos blandos y el esqueleto. Se diseccionan cuidadosamente los cuerpos de los fetos para buscar alteraciones de los tejidos blandos; esta operación puede incluir técnicas que permitan examinar más exhaustivamente la estructura cardíaca interna (25). Se toman las cabezas de la mitad de los fetos analizados de esta manera y se preparan para evaluar las alteraciones de los tejidos blandos (en particular, ojos, cerebro, conductos nasales y lengua), mediante técnicas clásicas de cortes seriados (26) u otro método que presente la misma sensibilidad. Se preparan los cuerpos de esos fetos y los de los fetos intactos restantes para el estudio de las alteraciones del esqueleto mediante los métodos descritos para los roedores.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada madre y su progenie y resumirse en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio compasivo, el número de hembras grávidas, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de observaciones de los embriones o fetos y todos los datos pertinentes sobre la camada.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado, tomando la camada como unidad para el análisis de los datos. La elección de los métodos estadísticos debe efectuarse en la fase de diseño del estudio y justificarse. Deben registrarse también los datos relativos a los animales que no sobrevivan hasta la fecha programada para el sacrificio y, si procede, pueden incluirse en las medias de los lotes. La pertinencia de dichos datos y, por tanto, la decisión de incluirlos o no en las medias de los lotes, debe valorarse caso por caso y justificarse.

2.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal deben evaluarse respecto a los efectos observados. La evaluación debe incluir la información siguiente:

— resultados de los ensayos en las madres y los embriones o fetos, incluida la evaluación de la relación, o la ausencia de relación, entre la exposición de los animales a la sustancia de ensayo y la incidencia y gravedad de todos los efectos observados,

— criterios aplicados, en su caso, para clasificar las alteraciones fetales externas, de los tejidos blandos y del esqueleto,

▼B

— si procede, datos previos relativos a los controles para afinar la interpretación de los resultados del estudio,

— cifras empleadas en el cálculo de todos los índices o porcentajes,

— análisis estadístico apropiado de los resultados del estudio e inclusión de información suficiente sobre el método empleado, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluarlo y reconstruirlo.

Si el estudio no pone de manifiesto ningún efecto tóxico, debe valorarse la pertinencia de efectuar experimentos complementarios para determinar la absorción y la biodisponibilidad de la sustancia de ensayo.

2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los estudios de toxicidad para el desarrollo prenatal proporcionan información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia administrada durante la gravidez en las madres y en el desarrollo intrauterino de su progenie. Los resultados del estudio han de interpretarse a la luz de los de los estudios de toxicidad subcrónica, reproducción, toxicocinéticos y de otro tipo. Dado que el estudio se centra tanto en la toxicidad general para la madre como en la toxicidad para el desarrollo, los resultados permiten distinguir en cierta medida los efectos sobre el desarrollo que se producen en ausencia de toxicidad general de los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para la madre (27).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas.

— identificación, incluido el número CAS si se conoce;

— pureza.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa empleada,

— número y edad de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

▼B

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede,

— condiciones ambientales,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados:

Datos relativos a la toxicidad para la madre en función de las dosis, indicando al menos lo siguiente:

— número de animales al principio del ensayo, número de animales supervivientes, número de hembras grávidas, número de abortos y número de partos prematuros,

— fecha de las muertes sobrevenidas durante el ensayo y número de animales que han sobrevivido hasta el sacrificio,

— datos sobre los animales que no hayan sobrevivido hasta el sacrificio, y no incluidos, en las comparaciones estadísticas entre lotes,

— día de la observación de cada signo clínico anómalo y evolución posterior,

— peso corporal, variación del mismo y peso del útero grávido, con inclusión facultativa de la variación del peso corporal corregida en función del peso del útero grávido,

— consumo de alimentos y de agua, si se ha medido,

— hallazgos de la autopsia, incluido el peso uterino,

— NOAEL relativas a los efectos sobre la madre y sobre el desarrollo.

Datos relativos al desarrollo por dosis y camada (con implantaciones), en particular:

— número de cuerpos amarillos,

— número de implantaciones, número y porcentaje de fetos vivos y muertos y número de resorciones,

— número y porcentaje de pérdidas pre y postimplantatorias.

Datos relativos al desarrollo por dosis y camada (con fetos vivos), en particular:

— número y porcentaje de crías vivas,

— proporción de machos y hembras,

— peso corporal de los fetos, preferiblemente por sexo y sin distinción por sexo,

— malformaciones externas, de los tejidos blandos y el esqueleto y otras alteraciones pertinentes,

— criterios de clasificación, si procede,

▼B

— número total y porcentaje de fetos y de camadas que presenten alguna alteración externa, de los tejidos blandos o el esqueleto; tipos e incidencia de cada anomalía y demás alteraciones pertinentes.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archivfur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for-Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9;:398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61 -63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principies and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Vamagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticida Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormialities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

B.32. ENSAYO DE CARCINOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 451 de la OCDE (2009). Las TG 451 originales sobre los estudios de carcinogénesis se adoptaron en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.32 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (2) (3) (4) (5) (6). La actualización de este método de ensayo B.32 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.30. Ensayo de toxicidad crónica y B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, con el fin de obtener más, información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. Este método de ensayo B.32 ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales. Conviene señalar, no obstante, que algunos pormenores y requisitos pueden variar en el caso de los productos farmacéuticos (véase el documento de orientación S1B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para los ensayos de carcinogénesis de los productos farmacéuticos).

2. La mayoría de los ensayos de carcinogénesis se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (6), con las debidas modificaciones. Se ofrecen más indicaciones sobre el diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de carcinogénesis son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la elección de la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de carcinogénesis. Si bien los estudios de carcinogénesis que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la carcinogénesis por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, parámetros clínicos e histopatológicos, etc. La OCDE dispone de documentación orientativa sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (7) (8) y por vía cutánea (7). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (8). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (11) del presente anexo.

▼M4

5. Un estudio de carcinogénesis proporciona información sobre los factores de riesgo para la salud derivados de la exposición continuada durante un período que puede llegar a ocupar la vida entera de la especie animal investigada. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema, incluida la carcinogénesis potencial, y puede ayudar a determinar los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede facilitar una estimación del máximo nivel de dosis sin efectos tóxicos observados (NOAEL) y, en el caso de carcinógenos no genotóxicos, de las respuestas tumorales, que servirá para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.

6. Los objetivos de los estudios de carcinogénesis realizados según este método de ensayo son:

— la identificación de las propiedades cancerígenas de una sustancia problema que puedan provocar una incidencia elevada de neoplasias, una mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo de aparición de las neoplasias, en comparación con los grupos de control,

— la identificación del órgano o los órganos diana de la carcinogénesis,

— la determinación del tiempo que tardan en aparecer las neoplasias,

— la caracterización de la relación dosis-respuesta tumoral,

— la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),

— la extrapolación de los efectos cancerígenos a los niveles de dosificación inferiores de la exposición humana,

— la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación de la carcinogenicidad potencial de una sustancia problema, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia estudiada antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en la carcinogenicidad potencial y minimizar el uso de animales. La información previa y la consideración en torno al modo de acción de un supuesto cancerígeno (2) (7) (12) (13) (14) (15) reviste particular importancia, toda vez que el diseño óptimo del ensayo de una sustancia química variará según se trate o no de un cancerígeno genotóxico hipotético o conocido. Se ofrecen otras consideraciones sobre el modo de acción en el documento de orientación nº 116 (7).

8. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo,* incluidos los ensayos de genotoxicidad; el uso o usos previstos y la exposición humana potencial; los datos de (Q)SAR previos y los datos de mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogenicidad y otros datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines; los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y

▼M4

los datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La evaluación de la carcinogénesis debe emprenderse una vez que se ha recabado la información inicial en los ensayos de toxicidad por administración continuada durante 28 días y/o 90 días. También pueden aportar una información valiosa los ensayos de inducción-estimulación de cáncer a corto plazo. Se hará un planteamiento secuencial de los estudios de carcinogénesis como parte de la evaluación global de los efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (16) (17) (18) (19).

9. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Aspectos importantes son el ajuste de la supervivencia en el análisis estadístico, el análisis de los riesgos tumorales acumulativos en relación con el tiempo de supervivencia, el análisis del tiempo que tarda en aparecer el tumor y el análisis en caso de terminación prematura de uno o más grupos. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y se hace referencia a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (7) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (20).

10. Cuando se efectúa un estudio de carcinogénesis, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de signos clínicos como parámetros compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (21), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o el sufrimiento, o reducir la dosis experimental.

11. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (7) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (22) (23). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo u objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los factores de riesgo, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y de su importancia, por otro. Ello tiene especial trascendencia cuando se proyecta (punto 12) un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 del presente anexo).

12. Se considerará la posibilidad de efectuar un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (capítulo B.30 de este anexo) y un ensayo de carcinogénesis (presente método de ensayo B.32). El ensayo combinado permite mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 11 y 22-25) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados.

▼M4

13. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 116 (7).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. La sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas, habitualmente por vía oral, a varios grupos de animales de experimentación durante la mayor parte de su existencia. También se aceptan las vías inhalatoria o cutánea. Se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad o lesiones neoplásicas. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

15. El presente método de ensayo está diseñado fundamentalmente para la determinación y evaluación de la carcinogénesis en roedores (punto 2). Se podrá considerar el uso de especies no roedoras cuando los datos previos indiquen que son más útiles para la predicción de los efectos sobre la salud humana. Se justificará la elección de la especie. La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Si bien el uso de ratones en los ensayos de carcinogénesis puede ser de utilidad limitada (24) (25) (26), algunas normativas en vigor siguen exigiendo que se realicen ensayos de carcinogénesis en ratones a no ser que se establezca que son científicamente innecesarios. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

16. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. Los ensayos de carcinogénesis se efectuarán preferiblemente en animales de la misma procedencia y cepa que los empleados en los estudios preliminares de toxicidad de duración menor; ahora bien, si los animales de esa procedencia y variedad han demostrado incapacidad para cumplir los criterios de supervivencia normalmente aceptados para los estudios a largo plazo [véase el documento de orientación nº 116 (7)], se planteará la posibilidad de usar una cepa que presente una tasa de supervivencia aceptable en los ensayos a largo plazo. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

Alojamiento y alimentación de los animales

17. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (27) (28) (29). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se

▼M4

mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Así mismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia problema se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de dicha sustancia y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

Preparación de los animales

18. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los, animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, que se le grabará de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio pertinente.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

19. Se emplearán animales de ambos sexos. Se estudiará un número de animales suficiente para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. Por consiguiente, cada grupo de dosis y de control deberá contener como mínimo 50 animales de cada sexo. Dependiendo de la finalidad del estudio, cabe la posibilidad de aumentar la potencia estadística de las estimaciones esenciales haciendo una asignación diferencial de los animales a los distintos grupos de dosis, de modo que haya más de 50 individuos en los grupos de dosis inferior; esto permite estimar el potencial carcinógeno a dosis bajas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento moderado del tamaño del grupo incrementará relativamente poco la potencia estadística del estudio. Se ofrece más información sobre el diseño estadístico y la selección de los niveles de dosis para maximizar la potencia estadística del estudio en el documento de orientación nº 116 (7).

Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela

20. Si está científicamente justificado, se puede hacer una provisión de animales para sacrificarlos durante el ensayo y así obtener datos sobre la progresión de las alteraciones neoplásicas y sobre los mecanismos de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración continuada realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Si en el diseño experimental se incluyen animales para sacrificarlos durante el ensayo, lo habitual es que el lote sacrificado esté compuesto por 10 animales de cada sexo, y el número total de animales investigados se incrementará en esta misma medida. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar su estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (30). Se ofrecen más indicaciones en el documento de orientación nº 116 (7).

▼M4

Grupos de dosis y posología

21. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis. Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

22. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Tomando en consideración los factores que se indican en el punto 23 que sigue, normalmente el nivel de dosis más elevado será tal que provoque signos de toxicidad, por ejemplo, manifestada por una merma de la ganancia de peso corporal (aproximadamente el 10 %). Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal.

23. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y, dependiendo del modo de acción de la sustancia problema, un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 25). Para establecer las dosis inferiores se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral, o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja.

24. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de las características de la sustancia y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.

25. Tal como se expone en el documento de orientación nº 116 (7), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:

— los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la relación dosis-respuesta,

— la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre la dosimetría externa e interna,

— las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,

— aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

▼M4

— aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,

— los niveles de exposición humana que cabe prever.

26. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema

27. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia problema se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

28. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.

29. Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administra con los alimentos, se puede usar una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.

▼M4

30. En los ensayos de administración oral, la sustancia problema se administra a los animales diariamente (siete días por semana), durante un período que suele ser de 24 meses en el caso de los roedores (véase también el punto 32). Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (11), durante un período de 24 meses. La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición será habitualmente de 24 meses. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (9).

31. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (31). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo.

Duración del estudio

32. La duración del estudio suele ser de 24 meses en el caso de los roedores, lo que constituye la mayor parte del período de existencia de los animales investigados. Siempre que se justifique, se podrán aplicar períodos mayores o menores en función del ciclo de vida de la especie y la cepa investigadas. En el caso de determinadas cepas de ratones, como AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, puede estar más justificada una duración de 18 meses. Seguidamente se facilitan algunas indicaciones acerca de la duración, la terminación del estudio y la supervivencia; otras consideraciones, entre ellas la aceptabilidad de un resultado de carcinogénesis negativa en función de la supervivencia observada en el estudio, se pueden consultar en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7) sobre el diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis.

— Se planteará la terminación del estudio cuando el número de supervivientes en los grupos de dosis más baja o de control sea menor del 25 por ciento.

— Si las muertes prematuras por toxicidad se producen solo en el grupo de dosis más elevada, ello no debe motivar la terminación del estudio.

— Se contabilizará por separado la supervivencia de cada sexo.

— El estudio no debe prolongarse más allá del instante en que los datos derivados del mismo se muestren insuficientes para permitir una evaluación estadísticamente significativa.

▼M4

OBSERVACIONES

33. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse además una observación diaria de los eventuales signos específicos de importancia toxicológica, teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda. Se prestará especial atención al desarrollo de tumores; se registrarán el momento de aparición y localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria

34. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

Hematología, bioquímica clínica y otras valoraciones

35. Con el fin de maximizar la información derivada de la investigación, especialmente en lo que se refiere al modo de acción, a criterio del director del estudio se podrán tomar muestras de sangre para análisis hematológicos y de bioquímica clínica. También pueden estar indicados los análisis de orina. En el documento de orientación nº 116 (7) se comenta el interés de obtener este tipo de muestras en el marco de un ensayo de carcinogénesis. Si se considera oportuno, se podrán obtener muestras de sangre para hematología y bioquímica clínica y muestras de orina para análisis, como mínimo en 10 animales de cada sexo y lote, tanto antes del sacrificio durante el ensayo (punto 20) como en el momento de su conclusión. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia y, en su caso, se conservarán en las debidas condiciones. También se pueden preparar frotis de sangre, especialmente si se sospecha que la médula ósea es el órgano diana, aunque se ha cuestionado el valor de estas muestras para la evaluación del potencial cancerígeno u oncógeno (32).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

36. Todos los animales del estudio excepto los centinela (véase el punto 20) y otros animales satélite se someterán a una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. La autopsia de los animales centinela y de otros animales satélite se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio. El pesaje de los órganos no suele formar parte de un estudio de carcinogénesis, dado que los cambios geriátricos y, en fases más avanzadas, el desarrollo de tumores introducen confusión en la interpretación de los datos sobre el peso de los órganos. No obstante, estos datos pueden ser cruciales para sopesar las pruebas y, especialmente, las consideraciones sobre el modo de acción. Si forman parte de un estudio satélite, se recogerán a lo más tardar un año después de iniciar el estudio.

▼**M4**

37. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (33) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Cápsulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Riñón	Hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitales)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]
Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, medio-dorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación tibiofemoral]	[Bulbo olfativo]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se conservarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 y B.29 del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

▼M4

Examen histopatológico

38. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (33). Como mínimo se examinarán los siguientes tejidos:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas, incluidos tumores,

— cuando se observen alteraciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis más elevada, los mismos tejidos afectados se examinarán en todos los animales de los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

DATOS E INFORME

Datos

39. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

40. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales de control del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines, y haberse generado en los cincos años precedentes al estudio en cuestión.

41. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 9). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

Informe del ensayo

42. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

▼**M4**

— Procedencia de la sustancia.

— Número de lote.

— Certificado de análisis químico.

Vehículo (si procede):

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

Animales de ensayo:

— Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.

— Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

— Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.

— Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.

— Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.

— Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

— Vía y método de administración de la sustancia problema.

— En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.

— Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.

— Datos sobre la calidad de los alimentos y del agua.

Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal)

Generalidades

— Datos de supervivencia.

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.

— Datos toxicocinéticos (en su caso).

— Oftalmoscopia (en su caso).

— Hematología (en su caso).

— Bioquímica clínica (en su caso).

▼M4

Observaciones clínicas:

— Signos de toxicidad.

— Incidencia (y, si se ha valorado, gravedad) de cualquier anomalía.

— Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

Resultados de la autopsia:

— Peso corporal en el momento de la muerte.

— Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).

— Observaciones de la autopsia; incidencia y gravedad de las anomalías.

Examen histopatológico:

— Observaciones histopatológicas de carácter no neoplásico.

— Observaciones histopatológicas neoplásicas.

— Correlación entre las observaciones macro y microscópicas.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento, con una clasificación de su gravedad.

— Informes sobre las eventuales evaluaciones de las preparaciones efectuadas por otros científicos.

Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.

La discusión de los resultados comprende lo siguiente:

— Discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.

— Relación dosis-respuesta.

— Datos sobre controles históricos.

— Otras informaciones sobre el modo de acción.

— Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.

— Relevancia para los seres humanos.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en roedores.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(10) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(11) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

B.33. **ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 453 de la OCDE (2009). Las TG 453 originales fueron adoptadas en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.33 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (1) (2) (3) (4) (5). La actualización de este método de ensayo B.33 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.32. Ensayo de carcinogénesis y B.30. Ensayo de toxicidad crónica, con el fin de obtener más información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. El presente método de ensayo ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales. Conviene señalar, no obstante, que algunos pormenores y requisitos pueden variar en el caso de los productos farmacéuticos (véase el documento de orientación S1B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para los ensayos de carcinogénesis de los productos farmacéuticos).

2. La mayoría de los ensayos de toxicidad crónica y de carcinogénesis se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (6), con las debidas modificaciones, tal como se especifica en el documento de orientación nº 116 de la OCDE sobre Diseño y realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (7).

3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de toxicidad crónica y carcinogénesis son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la elección de la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de toxicidad crónica y de carcinogénesis. Si bien los estudios de toxicidad crónica a largo plazo que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica y de la carcinogénesis por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, variables clínicas e histopatológicas, etc. La OCDE dispone de documentación orientativa sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (7) (8) y por vía cutánea (7). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (8). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (11) del presente anexo.

▼M4

5. Un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis proporciona información sobre los factores de riesgo para la salud derivados de la exposición continuada durante un período que puede llegar a ocupar la vida entera de la especie animal investigada. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema, incluida la carcinogénesis potencial, y puede ayudar a determinar los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede facilitar una estimación del máximo nivel de dosis sin efectos tóxicos observados (NOAEL) y, en el caso de cancerígenos no genotóxicos, de las respuestas tumorales, que servirá para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.

6. Los objetivos de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis realizados según este método de ensayo son:

— la identificación de las propiedades cancerígenas de una sustancia problema que puedan provocar una incidencia elevada de neoplasias, una mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo de aparición de las neoplasias, en comparación con los grupos de control,

— la determinación del tiempo que tardan en aparecer las neoplasias,

— la identificación de la toxicidad crónica de una sustancia problema,

— la identificación del órgano o los órganos diana de la toxicidad crónica y de la carcinogénesis,

— la caracterización de la relación dosis-respuesta,

— la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),

— la extrapolación de los efectos cancerígenos a los niveles de dosificación inferiores de la exposición humana,

— la predicción de los efectos de toxicidad crónica que se producirán a los niveles de exposición humana,

— la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación del potencial de carcinogénesis y de toxicidad crónica de una sustancia, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en sus propiedades toxicológicas y minimizar el uso de animales. La información previa y la consideración en torno al modo de acción de un supuesto cancerígeno (2) (7) (12) (13) (14) (15) reviste particular importancia, toda vez que el diseño óptimo del ensayo variará según se trate o no de un cancerígeno genotóxico hipotético o conocido. Se ofrecen otras consideraciones sobre el modo de acción en el documento de orientación nº 116 (7).

8. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, cualquier información referente al mecanismo de acción, los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *y* de genotoxicidad *in vitro* o *in vivo,* el uso o usos previstos y la exposición humana potencial, los datos de (Q)SAR previos, los datos de mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogénesis y otros datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines, los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de

▼M4

exposición continuada. La determinación de la toxicidad crónica y la carcinogénesis solo debe emprenderse una vez que se ha recabado la información toxicológica inicial en los ensayos de toxicidad por administración continuada durante 28 días y/o 90 días. También pueden aportar una información valiosa los ensayos de inducción-estimulación de cáncer a corto plazo. Se hará un planteamiento escalonado de los estudios de carcinogénesis como parte de la evaluación global de los potenciales efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (16) (17) (18) (19).

9. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Aspectos importantes son el ajuste de la supervivencia en el análisis estadístico, el análisis de los riesgos tumorales acumulativos en relación con el tiempo de supervivencia, el análisis del tiempo que tarda en aparecer el tumor y el análisis en caso de terminación prematura de uno o más grupos. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y se hace referencia a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (7) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (20).

10. Cuando se efectúa un estudio de carcinogénesis, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de signos clínicos como parámetros compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (21), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o sufrimiento, o reducir la dosis experimental.

11. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (7) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (22) (23). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo u objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los factores de riesgo, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y de su relevancia, por otro. Ello reviste particular importancia en este estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis.

12. Se considerará la posibilidad de efectuar el presente estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (capítulo B.30 de este anexo) y un ensayo de carcinogénesis (capítulo B.32 de este anexo). El ensayo combinado permite una mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, y reduce en cierta medida el uso de animales, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 11 y 22-26) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan más indicaciones sobre el diseño de los estudios combinados de toxicidad crónica y carcinogénesis dentro de los principios de máxima eficiencia para reducir el número de animales empleados y de aprovechamiento racional de los distintos métodos experimentales.

▼M4

13. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 116 (7).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. El diseño del estudio consta de dos fases paralelas, una de toxicidad crónica y otra de carcinogénesis (consúltense sus duraciones respectivas en los puntos 34 y 35). La sustancia problema se administra generalmente por vía oral, aunque también se aceptan las vías inhalatoria y cutánea. En la fase de toxicidad crónica, la sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas a varios lotes de animales experimentales, a razón de un nivel de dosis por lote, normalmente durante un período de 12 meses, si bien este puede reducirse o prolongarse en función de los requisitos normativos (véase el punto 34). La duración del estudio será suficiente para permitir que se manifiesten los posibles efectos de toxicidad acumulativa, pero sin que se confundan con las alteraciones geriátricas. El diseño del estudio puede contemplar el sacrificio de uno o más animales durante el ensayo, por ejemplo a los 3 y a los 6 meses, y a tal efecto se podrán prever lotes complementarios de animales (véase el punto 20). En la fase de carcinogénesis, la sustancia problema se administra diariamente a varios lotes de animales experimentales durante la mayor parte de su existencia. Se observa atentamente a los animales en ambas fases por si aparecen signos de toxicidad o lesiones neoplásicas. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

15. El presente método de ensayo está diseñado fundamentalmente para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica y la carcinogénesis en roedores (punto 2). Se podrá considerar el uso de especies no roedoras cuando los datos previos indiquen que son más útiles para la predicción de los efectos sobre la salud humana. Se justificará la elección de la especie. La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Si bien el uso de ratones en los ensayos de carcinogénesis puede ser de utilidad limitada (24) (25) (26), algunas normativas en vigor siguen exigiendo que se realicen ensayos de carcinogénesis en ratones a no ser que se establezca que son científicamente innecesarios. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. El diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en especies no roedoras, cuando proceda, se basará en los principios que se recogen en el presente método de ensayo y en el capítulo B.27 de este anexo, Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en no roedores (6). Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

16. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. Los estudios combinados de toxicidad crónica y carcinogénesis se efectuarán preferiblemente en animales de la misma procedencia y cepa que los empleados en los estudios preliminares de toxicidad de duración menor; ahora bien, si los animales de esa procedencia y variedad han demostrado incapacidad para cumplir los criterios de supervivencia normalmente aceptados para los estudios a largo plazo [véase el documento de orientación nº 116 (7)], se planteará la posibilidad de usar una cepa que presente una tasa de supervivencia aceptable en los ensayos a largo plazo. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

▼M4

Alojamiento y alimentación

17. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (27) (28) (29). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Asímismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de la sustancia problema y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

Preparación de los animales

18. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, que se le grabará de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio pertinente.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

19. Se emplearán animales de ambos sexos. Se empleará un número de animales suficiente para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. En el caso de los roedores, por tanto, cada grupo de dosis (como se describe en el punto 22) y de control simultáneo empleados en la fase de carcinogénesis del estudio deberá contener como mínimo 50 animales de cada sexo. Dependiendo de la finalidad del estudio, cabe la posibilidad de aumentar la potencia estadística de las estimaciones esenciales haciendo una asignación diferencial de los animales a los distintos grupos de dosis, de modo que haya más de 50 individuos en los grupos de dosis inferior; esto permite estimar el potencial carcinógeno a dosis bajas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento moderado del tamaño del grupo incrementará relativamente poco la potencia estadística del estudio. En el caso de los roedores, cada grupo de dosis (como se describe en el punto 22) y de

▼M4

control simultáneo empleado en la fase de toxicidad crónica del estudio deberá contener como mínimo 10 animales de cada sexo. Conviene señalar que este número es menor que en el estudio de toxicidad crónica (capítulo B.30 del presente anexo). No obstante, la interpretación de los datos obtenidos con los lotes reducidos en la fase de toxicidad crónica de este estudio combinado estará respaldada por los datos de los lotes más numerosos empleados en la fase de carcinogénesis. En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales en cada grupo de dosificación de la fase de toxicidad crónica para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias. Se ofrece más información sobre el diseño estadístico y la selección de los niveles de dosis para maximizar la potencia estadística del estudio en el documento de orientación nº 116 (7).

Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela

20. Si está científicamente justificado, se puede hacer una provisión de animales para sacrificarlos durante el ensayo, por ejemplo a los 6 meses en la fase de toxicidad crónica, y así obtener datos sobre la progresión de las alteraciones no neoplásicas y sobre los mecanismos de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración continuada realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Los animales sacrificados en el transcurso de la fase de toxicidad crónica del estudio, normalmente de 12 meses de duración (punto 34), proporcionan datos útiles para la fase de carcinogénesis, lo que permite reducir el número global de animales estudiados. Cabe la posibilidad de incluir lotes satélite en la fase de toxicidad crónica del estudio para controlar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema. Generalmente, estos se limitan al lote del nivel de dosis más elevado del estudio y al lote de control. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar el estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (30). En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan más indicaciones sobre el diseño del estudio y la provisión del mínimo número posible de animales para el sacrificio y para los lotes satélite y centinela.

21. Si en el diseño experimental se incluyen animales satélite y/o para sacrificarlos durante el ensayo, lo habitual es que los lotes destinados a estos fines estén compuestos por 10 animales de cada sexo, y el número total de animales investigados se incrementará en esta misma medida. Los animales satélite y los sacrificados durante el ensayo se someten generalmente a las mismas observaciones (peso corporal, consumo de agua y alimentos, valoraciones de hematología y bioquímica clínica e investigaciones anatomopatológicas) que los animales observados en la fase de toxicidad crónica del estudio principal, aunque se puede establecer que, en los lotes que se sacrifiquen durante el ensayo, se restrinja dicha evaluación a aspectos cruciales como la neurotoxicidad o la inmunotoxicidad.

Grupos de dosis y posología

22. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis. Tanto en la fase de toxicidad crónica como en la de carcinogénesis, se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

▼M4

23. En la fase de toxicidad crónica puede no ser necesario hacer un estudio completo con tres niveles de dosis, si se considera que no cabe esperar efectos adversos con un nivel de dosis equivalente como mínimo a 1 000 mg/kg peso corporal/día. Esta decisión se basará en informaciones procedentes de estudios preliminares y en la consideración de que no cabe esperar toxicidad a tenor de los datos de sustancias estructuralmente afines. Se puede establecer un límite de 1 000 mg/kg peso corporal/día, salvo si la exposición humana previsible indica la necesidad de emplear un nivel de dosis más elevado.

24. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Normalmente, el nivel de dosis superior se seleccionará de modo que induzca signos de toxicidad, como una merma en la ganancia de peso corporal (de aproximadamente el 10 %). Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal.

25. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y, dependiendo del modo de acción de la sustancia problema, un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 27). Para establecer las dosis inferiores se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral, o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja. Cuando se lleva a cabo un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, la finalidad principal es obtener información que permita evaluar el riesgo de carcinogénesis y, normalmente, la información sobre la toxicidad crónica es secundaria. Habrá que tener esto en cuenta al seleccionar los niveles de dosis y los intervalos de administración.

26. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de los objetivos del estudio y de las características de la sustancia problema y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.

27. Tal como se recoge en el documento de orientación nº 116 (7), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:

— los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la ecuación dosis-respuesta,

— la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre las dosis externas e internas,

— las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,

▼M4

— aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

— aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,

— los niveles de exposición humana que cabe prever, especialmente cuando se seleccionan las dosis intermedias y bajas.

28. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema

29. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

30. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.

31. Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.

▼M4

32. En el caso de la administración oral, las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales (7 días por semana) durante un período de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis); véanse también los puntos 33 y 34. Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (11), durante un período de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis). La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición es habitualmente de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis). Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (9).

33. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (31). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo.

Duración del estudio

34. Si bien el período de administración y la duración de la fase crónica de este estudio es normalmente de 12 meses, su diseño permite aplicarlo a ensayos de duración menor (6 o 9 meses) o mayor (18 o 24 meses), en función de los requisitos normativos particulares o de los mecanismos específicos que se pretenda investigar. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. Los animales de todos los grupos de dosis asignados a esta fase serán sacrificados en el momento previsto para la evaluación de la toxicidad crónica y las alteraciones anatomopatológicas no neoplásicas. Concluida la exposición, los lotes satélite incluidos para comprobar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema deben mantenerse sin administración durante un período no inferior a 4 semanas ni superior a un tercio de la duración total del estudio.

35. La duración de la fase de carcinogénesis de este estudio suele ser de 24 meses en el caso de los roedores, lo que constituye la mayor parte del período de existencia de los animales investigados. Siempre que se justifique, se podrán aplicar períodos mayores o menores en función del ciclo de vida de la especie y la cepa investigadas. En el caso de determinadas cepas de ratones, como AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, puede estar más justificada una duración de 18 meses. Seguidamente se facilitan algunas indicaciones acerca de la duración, la terminación del estudio y la supervivencia; otras consideraciones, entre ellas la aceptabilidad de un resultado de carcinogénesis negativa en función de la supervivencia observada en el estudio, se pueden consultar en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

▼M4

— Se planteará la terminación del estudio cuando el número de supervivientes en los grupos de dosis más baja o de control sea menor del 25 por ciento.

— Si las muertes prematuras por toxicidad se producen solo en el grupo de dosis más elevada, ello no debe motivar la terminación del estudio.

— Se contabilizará por separado la supervivencia de cada sexo.

— El estudio no debe prolongarse más allá del instante en que los datos derivados del mismo se muestren insuficientes para permitir una evaluación estadísticamente significativa.

OBSERVACIONES (FASE DE TOXICIDAD CRÓNICA)

36. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda.

37. Se someterán todos los animales a observación clínica exhaustiva como mínimo antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto), al concluir la primera semana de estudio y, en lo sucesivo, con periodicidad mensual. El protocolo de tales observaciones se organizará con el fin de minimizar las variaciones entre los observadores individuales y entre los distintos lotes experimentales. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (32).

38. Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado a todos los animales antes de administrar la sustancia problema. Al concluir el estudio, el mismo examen se practicará preferiblemente a todos los animales y, obligatoriamente, a los lotes de control y de dosis más elevada. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás. Si el análisis estructural o cualquier otra información indica toxicidad oftálmica, se aumentará la frecuencia de las exploraciones oftalmológicas.

39. Cuando se trate de sustancias para las que estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días hayan demostrado efectos neurotóxicos, las pruebas de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (32) [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (33) (34) (35)], así como la evaluación de la fuerza prensil (36) y de la actividad motriz (37), podrán hacerse facultativamente antes de iniciar el estudio, a intervalos de 3 meses durante el mismo hasta un máximo de 12 meses inclusive, y a la conclusión del estudio (si dura más de 12 meses). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

▼M4

40. Cuando los estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días indiquen que la sustancia tiene capacidad inmunotóxica, al concluir el estudio se podrán proseguir las investigaciones de este parámetro.

Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria

41. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará asimismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

Hematología y bioquímica clínica

42. En las investigaciones realizadas con roedores, se practicarán exámenes hematológicos en todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo) a los 3, 6 y 12 meses y al concluir el estudio (si dura más de 12 meses). En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales satélite para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias (véase el punto 19). Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras más pequeñas de animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros hematológicos en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia.

43. Se investigarán los siguientes parámetros (38): recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos y de plaquetas, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada. Pueden determinarse además otros parámetros hematológicos como los cuerpos de Heinz, la morfología de otros eritrocitos atípicos o los valores de metahemoglobina, en función de la toxicidad de la sustancia problema. El planteamiento general ha de ser flexible, y adaptado a los efectos observados o esperados de la sustancia problema. Si esta ejerce efectos sobre el sistema hematopoyético, pueden estar indicados recuentos de reticulocitos y una citología de la médula ósea, que no son valoraciones habituales.

44. En los intervalos de tiempo especificados para determinar las variables hematológicas, se realizarán valoraciones de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos sobre los tejidos y, específicamente, sobre los riñones y el hígado en las muestras de sangre obtenidas de todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo). En el caso de los ratones, pueden hacer falta animales satélite para efectuar todas las valoraciones necesarias de bioquímica clínica. Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras de menos animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros de bioquímica clínica en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Se recomienda que los

▼M4

animales (a excepción de los ratones) estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras ([1]). Se investigarán los siguientes parámetros (38): glucosa, urea (nitrógeno ureico), creatinina, proteínas totales, albúmina, calcio, sodio, potasio, colesterol total, al menos dos pruebas completas de la función hepatocelular (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa, ácidos biliares totales) (39) y al menos dos pruebas completas de la función hepatobiliar (fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina total, ácidos biliares totales) (39). Cuando proceda y a tenor de la toxicidad de la sustancia problema, pueden hacerse otras valoraciones de bioquímica clínica como las de triglicéridos en ayunas, hormonas específicas y colinesterasa. Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

45. Se practicarán análisis de orina en todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo), sobre muestras recogidas respetando los mismos intervalos que en los análisis de hematología y bioquímica clínica. Las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los análisis de orina en un estudio previo efectuado durante 90 días con dosis afines. Las recomendaciones hechas por expertos acerca de los estudios de patología clínica incluyen los siguientes parámetros (38): aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas totales y glucosa. Otras valoraciones son cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre oculta. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

46. De manera general, se acepta que es necesario disponer de valores basales de hematología y bioquímica clínica antes de someter a estudio a los perros, pero no en el caso de las especies roedoras (38). Ahora bien, si los datos basales históricos (véase el punto 58) son insuficientes, se considerará la oportunidad de generar estos datos.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

47. Como norma debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Sin embargo, se puede prever además la realización solo (en lotes satélite o animales sacrificados durante el ensayo) de valoraciones clave específicas, por ejemplo de neurotoxicidad o inmunotoxicidad (véase el punto 21). Estos animales no tienen que someterse a autopsia ni a las consiguientes exploraciones que se describen a continuación. La autopsia de los animales centinela se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio.

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, el ayuno desde la víspera puede influir en el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia problema se administra con los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Todos los animales se deben examinar en las mismas condiciones fisiológicas, por lo que se aconseja programar las evaluaciones neurológicas y detalladas en un día distinto del destinado a la toma de muestras para bioquímica clínica.

▼**M4**

48. Se registrará el peso de los órganos de todos los animales, salvo los que quedan excluidos en la última parte del punto 47. Las cápsulas suprarrenales, encéfalo, epidídimo, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, tiroides (que se pesará después de la fijación, con las paratiroides) y útero de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará el peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

49. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (40) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Glándulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo y protuberancia)	Riñón	hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitarias)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]
Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, medio dorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación tibiofemoral]	[Bulbo olfatorio]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

▼M4

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se examinarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

50. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (40). Como mínimo, el examen histopatológico debe hacerse sobre:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas,

— los tejidos diana (o los tejidos que presenten alteraciones relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis máxima) de todos los animales pertenecientes a los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

OBSERVACIONES (FASE DE CARCINOGÉNESIS)

51. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse además una observación diaria de los eventuales signos específicos de importancia toxicológica. En los ensayos en que se emplee sonda, los animales se examinarán en el período inmediatamente posterior a la administración. Se prestará especial atención al desarrollo de tumores; se registrarán el momento de aparición y localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

52. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

▼M4

Hematología, bioquímica clínica y otras valoraciones

53. Con el fin de maximizar la información derivada de la investigación, especialmente en lo que se refiere al modo de acción, a criterio del director del estudio se podrán tomar muestras de sangre para análisis hematológicos y de bioquímica clínica. También pueden estar indicados los análisis de orina. Los datos de los animales empleados en la fase de toxicidad crónica del estudio, normalmente de 12 meses de duración (punto 34), proporcionarán información sobre dichos parámetros. En el documento de orientación nº 116 (7) se comenta el interés de obtener este tipo de muestras en el marco de un ensayo de carcinogénesis. Si se toman muestras de sangre será al final del período de ensayo, justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia. También se pueden preparar frotis de sangre, especialmente si se sospecha que la médula ósea es el órgano diana, aunque se ha cuestionado el valor de obtener estas muestras en la fase de carcinogénesis para la evaluación del potencial cancerígeno u oncógeno (38).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

54. Todos los animales del estudio excepto los centinela y otros animales satélite (véase el punto 20) se someterán a una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. La autopsia de los animales centinela y de otros animales satélite se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio. El pesaje de los órganos no suele formar parte de un estudio de carcinogénesis, dado que los cambios geriátricos y, en fases más avanzadas, el desarrollo de tumores introducen confusión en la interpretación de los datos sobre el peso de los órganos. No obstante, estos datos pueden ser cruciales para sopesar las pruebas y, especialmente, las consideraciones sobre el modo de acción. Si forman parte de un estudio satélite, se recogerán a lo más tardar un año después de iniciar el estudio.

55. Los tejidos que se mencionan a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (40) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Cápsulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Riñón	Hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitales)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]
Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria

▼M4

Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, medio-dorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación tibio-femoral]	[Bulbo olfativo]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se examinarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

56. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (40). Como mínimo se examinarán los siguientes tejidos:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas, incluidos tumores,

— cuando se observen alteraciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis más elevada, los mismos tejidos afectados se examinarán en todos los animales de los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

▼M4

DATOS E INFORME (TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS)

Datos

57. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

58. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales de control del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines que hayan sido analizados en los cincos años precedentes al estudio en cuestión.

59. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 9). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

60. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

— Procedencia de la sustancia.

— Número de lote.

— Certificado de análisis químico.

Vehículo (si procede):

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

Animales de ensayo:

— Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.

— Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

▼**M4**

Condiciones del ensayo:

— Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.

— Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.

— Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.

— Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

— Vía y método de administración de la sustancia problema.

— En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.

— Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.

— Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal).

Generalidades:

— Datos de supervivencia.

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.

— Datos toxicocinéticos, si los hay.

— Oftalmoscopia (en su caso).

— Hematología (en su caso).

— Bioquímica clínica (en su caso).

Observaciones clínicas:

— Signos de toxicidad.

— Incidencia (y, si se ha valorado, gravedad) de cualquier anomalía.

— Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

Resultados de la autopsia:

— Peso corporal en el momento de la muerte.

— Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).

— Observaciones de la autopsia; incidencia y gravedad de las anomalías.

Examen histopatológico:

— Observaciones histopatológicas de carácter no neoplásico.

— Observaciones histopatológicas neoplásicas.

▼M4

— Correlación entre las observaciones macro y microscópicas.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento, con una escala de clasificación de su gravedad.

— Informes sobre las eventuales evaluaciones de las preparaciones efectuadas por otros científicos.

Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.

Discusión de los resultados:

— Discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.

— Relación dosis-respuesta.

— Datos sobre controles históricos.

— Otras informaciones sobre el modo de acción.

— Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.

— Relevancia para los seres humanos.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(10) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(11) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

▼M4

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼M4

(27) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼B

B.34. **ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P) recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos, para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en el estro. A continuación, se aparea a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparativos

Antes de la prueba, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante el período experimental apropiado. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, estos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

▼B

Animales de experimentación

Las especies preferidas son la rata y el ratón.

Han de utilizarse animales sanos, no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él.

El objetivo es conseguir gestaciones y progenie suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno de los animales de la generación P así como en la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F, desde la concepción al destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum*. Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden suministrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química, o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 o 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia dé toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo de alteración del rendimiento reproductor, serán necesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, serán necesarios estudios con otras dosis.

▼B

Procedimiento

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 a 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considerara conveniente la producción de una segunda camada; se les sacrificará y examinará en algún momento antes de finalizar el estudio. En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de 5 días de aclimatación, por lo menos, y continuará durante al menos 2 semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación F_1. Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido 3 semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquel en que se encuentre un tapón vaginal o esperma.

Las parejas que no se apareen se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente.

Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar a su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, 4 machos y 4 hembras por camada.

Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con 4 de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, 5 machos y 3 hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de 8 crías.

▼B

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y de apareamiento, puede determinarse a diario el consumo de alimento. Tras el parto y durante la lactancia, se determinará el consumo de alimento (o de agua cuando la sustancia en estudio se administre en el agua de bebida) en los mismos días en que se pesen las camadas. Los machos y hembras P se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales.

Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

Patología

Autopsia

Cuando los animales de la generación P se sacrifiquen, o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectores de todos los animales P. En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales con dosis máxima y en los controles y en los animales que mueran durante el estudio, siempre que sea posible.

Se examinarán entonces, en todos los demás animales P, los órganos que muestren anomalías en aquellos. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado al exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

▼B

2. **RESULTADOS**

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de machos fértiles, el de hembras grávidas, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración,

Cuando sea posible, los resultados numéricos se enumerarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie y cepa utilizada,

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad,

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta el día previstopara el sacrificio al final del estudio,

— tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio,

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento postnatal,

— día de observación de cada signo anómalo y su evolución,

— datos de peso de los animales P,

— hallazgos de autopsia,

— descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

B.35. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 416 (2001).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones tiene por objeto proporcionar información general sobre los efectos de una sustancia de ensayo en la integridad y funcionamiento del aparato reproductor del macho y la hembra, en particular, la función gonadal, ciclo estrual, comportamiento relativo al apareamiento, concepción, gestación, parto, lactancia y destete, así como el desarrollo y crecimiento de la progenie. El estudio también puede mostrar los efectos de la sustancia de ensayo en la morbilidad y mortalidad neonatales, proporcionar datos preliminares sobre la toxicidad para el desarrollo prenatal y postnatal y servir de orientación para ensayos posteriores. Además de estudiar el desarrollo y crecimiento de la generación F1, el ensayo tiene por objeto evaluar la integridad y el funcionamiento del aparato reproductor del macho y la hembra, así como el desarrollo y crecimiento de la generación F2. Puede obtenerse mayor información sobre la toxicidad para el desarrollo y las deficiencias funcionales completando el presente protocolo mediante estudios descritos en los ensayos de toxicidad para el desarrollo y/o neurotoxicidad para el desarrollo, según proceda, o estudiando dichos aspectos de forma independiente empleando métodos de ensayo apropiados.

1.2. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra la sustancia de ensayo en dosis escalonadas a varios lotes de machos y hembras. En el caso de los machos de la generación P (generación parental), se administra a lo largo del crecimiento y al menos durante un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 en la rata) para poder observar los posibles efectos adversos sobre la espermatogénesis. Los efectos en el esperma se valoran mediante diversos parámetros (morfología y motilidad de los espermatozoides, etc.), preparaciones tisulares y análisis histopatológico exhaustivo. Si se dispone de datos relativos a la espermatogénesis obtenidos en estudios previos con dosis repetidas de duración suficiente (por ejemplo, 90 días), no será preciso incluir los machos de la generación P en la evaluación. No obstante, se recomienda conservar muestras o grabaciones digitales del esperma de esta generación para su posterior evaluación. La sustancia de ensayo se administra a las hembras de la generación P durante el crecimiento y a lo largo de varios ciclos estruales completos para detectar todos los efectos adversos en el ciclo estrual. Asimismo, se administra a los animales de la generación P durante el período de apareamiento y las gravideces resultantes hasta el destete de su descendencia (generación F1). Tras el destete, se sigue administrando la sustancia a la generación F1 durante todo el crecimiento, el período de apareamiento y el nacimiento de la generación F2, hasta el destete de esta última.

Se someten todos los animales a observación clínica y examen patológico para detectar signos de toxicidad. El examen tendrá por objeto principal evaluar los efectos sobre la integridad y el funcionamiento del aparato reproductor de las hembras y los machos y sobre el desarrollo y crecimiento de la descendencia.

▼B

1.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.3.1. **Selección de la especie animal**

La especie idónea para el ensayo es la rata. Si se emplea otra distinta, debe justificarse y procederse a las adaptaciones pertinentes. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Al principio del experimento, la variación ponderal de los animales empleados ha de ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo.

1.3.2. **Condiciones de alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ºC (± 3º) y con una humedad relativa mínima del 30 % y preferiblemente inferior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, si bien lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta.

Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobado el apareamiento, las hembras que se hayan apareado se colocarán en jaulas individuales preparadas para el parto y la maternidad. También pueden enjaularse en grupos reducidos y separarse uno o dos días antes del parto. Cuando se acerque la fecha de este, se les proporcionará material adecuado y determinado de nidificación.

1.3.3. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales jóvenes sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Es preciso conocer las relaciones de consanguinidad entre los animales para evitar el apareamiento entre hermanos. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control (se recomienda agruparlos por niveles ponderales). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto. Los animales de la generación P deben numerarse antes de iniciar el tratamiento y los de la generación F1 que se seleccionen para el apareamiento, en el momento del destete. Debe registrarse la camada de origen de todos los animales de la generación F1 seleccionados. Además de ello, se recomienda identificar cada cría tan pronto como sea posible tras el nacimiento si se tiene intención de pesarlas por separado o someterlas a ensayos funcionales.

Los animales de la generación P han de tener entre 5 y 9 semanas de edad cuando se inicie el tratamiento. Los lotes de ensayo han de ser tan homogéneos como sea posible por lo que respecta al peso y edad de los animales.

▼B

1.4. PROCEDIMIENTO

1.4.1. **Número y sexo de los animales**

Cada lote de ensayo y de control debe estar integrado por una cantidad de animales que permita disponer de un mínimo de 20 hembras grávidas a término o casi. En el caso de las sustancias que provocan efectos indeseables (por ejemplo, esterilidad o toxicidad excesiva a la dosis más alta), puede resultar imposible. Se trata de obtener un número suficiente de hembras grávidas para realizar una evaluación significativa de los efectos de la sustancia de ensayo sobre la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno, así como sobre la lactancia, desarrollo y crecimiento dé la descendencia F1 desde la concepción hasta la madurez, y sobre el desarrollo de la generación F2 hasta el destete. Por consiguiente, el hecho de no conseguir el número deseado de hembras grávidas (es decir, 20) no invalida necesariamente el estudio y debe valorarse caso por caso.

1.4.2. **Preparación de las dosis**

Se recomienda administrar la sustancia de ensayo por vía oral (con el alimento o el agua de bebida o por sonda), salvo que se considere más apropiado emplear otra vía (cutánea o inhalatoria).

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en el vehículo.

1.4.3. **Posología**

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. A menos que las características fisicoquímicas o las propiedades biológicas de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. En caso de que se produzca un índice de mortalidad inesperado, si el correspondiente a la generación P es inferior al 10 % aproximadamente, el estudio sigue siendo aceptable. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las reacciones en función de la dosis y la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si la sustancia de ensayo se añade a los alimentos, el intervalo entre las dosis no debe superar un factor de 3. Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad, en particular los resultados de los estudios de dosis repetidas, y la información complementaria relativa al metabolismo y la cinética de la sustancia de ensayo o productos afines. Dicha información servirá asimismo para justificar la pertinencia de la gama de dosis.

▼B

Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia de ensayo, pero sí el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. Salvo por lo que respecta a la administración de sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. En su caso, los lotes de control han de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta o asimilación, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo. En lugar de ello, pueden emplearse los resultados de estudios de control destinados a evaluar los efectos de la disminución del consumo de alimentos sobre los parámetros de la reproducción.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales.

1.4.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente al menos a 1 000 mg/kg peso corporal/día, administrada por vía oral, o un porcentaje equivalente si se incorpora en los alimentos o el agua, y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable en los padres ni en la progenie y si, a la luz de los datos disponibles (por ejemplo, sobre sustancias con características estructurales y/o metabólicas similares), no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis oral superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo (solubilidad, etc.) las que determinan y limitan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse.

1.4.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo se administra diariamente a los animales, los 7 días de la semana y preferiblemente por vía oral (con los alimentos o el agua de bebida o por sonda). En caso de emplearse otra vía, debe justificarse y efectuarse las modificaciones oportunas. Se utilizará la misma forma de administración para todos los animales durante el período experimental apropiado. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica. El volumen máximo de líquido administrado de una sola vez no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal (0,4 ml/100 g de peso corporal en caso de que se emplee aceite de maíz como vehículo), salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis. En los ensayos en que se emplee sonda, en principio las crías reciben la sustancia de ensayo indirectamente a través de la leche materna hasta que se inicia la administración directa en el destete. En los estudios en que la sustancia de ensayo se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, las crías también la reciben directamente cuando empiezan a alimentarse solas en la última semana de lactancia.

▼B

Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante respecto al peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal. El ajuste deberá tener presente la difusión placentaria.

1.4.6. **Programa experimental**

La administración diaria de la sustancia de ensayo a los machos y las hembras de la generación P se inicia cuando tienen entre 5 y 9 semanas de edad y a los de la generación F1, en el destete. Debe tenerse presente que cuando la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, las crías de la generación F1 ya han estado expuestas directamente durante la lactancia. Se sigue administrando la sustancia a los animales de ambos sexos de las generaciones P y F1 al menos durante 10 semanas antes del período de apareamiento y durante las dos semanas de dicho período. Los machos que no vayan a emplearse para evaluar los efectos sobre la reproducción se sacrifican por métodos compasivos y se estudian. La sustancia de ensayo sigue administrándose a las hembras de la generación P durante la gestación y hasta el destete de su progenie F1. Puede ser oportuno modificar el programa de administración de las dosis a la luz de la información disponible sobre la sustancia de ensayo, en particular sobre la toxicidad, la inducción metabólica o la bioacumulación. Por lo general, la dosis que se administra a cada animal se calcula con arreglo a la última determinación del peso corporal, si bien conviene ser prudente al adaptar la dosis en el último período de la gestación.

Los machos y hembras de las generaciones P y F1 siguen recibiendo sustancia de ensayo hasta que sean sacrificados por métodos compasivos, cuando ya no sean necesarios para evaluar los efectos sobre la reproducción. Los descendientes F1 que no se seleccionen para el apareamiento y todos los descendientes F2 se sacrificarán por métodos compasivos después del destete.

1.4.7. **Apareamiento**

1.4.7.1. *Apareamiento de la generación parental (P)*

Para cada apareamiento, se juntan una hembra y un macho tratados con la misma dosis (apareamiento 1:1) hasta que se produzca la cópula o durante 2 semanas. Las hembras se observan todos los días para detectar la presencia de esperma o tapón vaginal. El día 0 de la gestación es el día en que se observa un tapón vaginal o la presencia de esperma. Si no se produce apareamiento, puede plantearse otro intento con hembras y machos de comprobada capacidad reproductora del mismo lote. Las parejas deben quedar claramente identificadas en los resultados. Debe evitarse el apareamiento entre animales hermanos.

▼B

1.4.7.2. *Apareamiento de la generación F1*

Se seleccionan al menos un macho y una hembra de cada camada de la generación F1 en el momento del destete con objeto de aparearlos con otras crías tratadas con la misma dosis, pero pertenecientes a otra camada, para obtener la generación F2. La selección de las crías de la misma camada debe hacerse al azar si no presentan diferencias significativas de peso corporal ni de aspecto. Si se observan diferencias, se seleccionan los mejores ejemplares de cada camada. Desde el punto de vista pragmático, resulta más fácil seleccionarlos en función del peso corporal, si bien puede estar más indicado basarse en el aspecto. Los descendientes F1 no deben aparearse antes de alcanzar la plena madurez sexual.

Las parejas sin descendencia deben estudiarse con objeto de determinar la causa aparente de infertilidad. Para ello, puede dárseles otras oportunidades de aparearse con machos o hembras de comprobada capacidad reproductora, efectuarse el examen microscópico de los órganos reproductores o estudiarse los ciclos estruales o la espermatogénesis.

1.4.7.3. *Segundo apareamiento*

En algunos casos, en particular cuando las dimensiones de la camada se ven modificadas por el tratamiento o cuando se observa un efecto equívoco en el primer apareamiento, se recomienda volver a aparear los adultos P o F1 para obtener una segunda camada. Conviene volver a aparear las hembras o machos que no hayan engendrado con un reproductor o reproductora de capacidad comprobada. Si se considera necesaria una segunda camada de alguna de las generaciones, los animales deben aparearse más o menos una semana después del destete de la primera camada.

1.4.7.4. *Dimensión de la camada*

Se deja que los animales paran y críen con normalidad a su progenie hasta el destete. La normalización de la dimensión de las camadas es facultativa. Si se lleva a cabo, debe describirse detalladamente el método empleado.

1.5. OBSERVACIONES

1.5.1. **Observaciones clínicas**

Debe hacerse una observación clínica general una vez al día y, en caso de administración por sonda, teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registran los cambios en el comportamiento, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad. Además de ello, al menos una vez por semana se examinan todos los animales de forma más exhaustiva; puede hacerse coincidiendo con los días en que se pesen los animales. Se examinan todos los animales dos veces al día y una vez al día durante los fines de semana, según proceda, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

▼B

1.5.2. **Peso corporal y consumo de alimentos y agua de los animales parentales**

Los animales de las generaciones P y F1 deben pesarse el día de la primera administración y a continuación al menos una vez por semana. Las madres (P y F1) se pesan, al menos, los días 0, 7, 14 y 20 o 21 de la gestación; durante la lactancia, los mismos días en que se pesen las crías y, por último, el día del sacrificio. Los resultados se registran para cada animal adulto por separado. Durante el período previo al apareamiento y durante la gestación, se mide al menos una vez por semana el consumo de alimentos. Si la sustancia de ensayo se administra con el agua, el consumo de esta se mide al menos una vez por semana.

1.5.3. **Ciclo estrual**

Se estudia la duración y normalidad del ciclo estrual en las hembras P y F1 mediante frotis vaginales antes del apareamiento y, con carácter facultativo, durante este, hasta que se compruebe que ha habido apareamiento. La toma de células vaginales o cervicales ha de hacerse con cuidado para no dañar la mucosa y evitar una pseudogestación (1).

1.5.4. **Parámetros de evaluación del esperma**

Se registra el peso de los testículos y epidídimos de todos los machos P y F1 tras el sacrificio y se conserva un ejemplar de cada órgano para el examen histopatológico (véanse los apartados 1.5.7 y 1.5.8.1). Se conservan los testículos y epidídimos restantes de un sublote integrado al menos por 10 machos de cada grupo de machos P y F1, para contar las espermátides resistentes a la homogeneización y los espermatozoos almacenados en la cola del epidídimo, respectivamente. En ese mismo sublote de machos, se recoge el contenido de la cola del epidídimo o el conducto deferente para evaluar la motilidad y morfología de los espermatozoides. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento o los resultados de otros estudios ponen de manifiesto que la sustancia de ensayo puede afectar a la espermatogénesis, debe efectuarse la evaluación del esperma en todos los machos de cada lote tratado; en caso contrario, el recuento puede limitarse a los machos P y F1 del lote de control y los lotes tratados con la dosis superior.

Debe contarse la totalidad de las espermátides testiculares resistentes a la homogeneización y los espermatozoos de la cola del epidídimo (2) (3). La reserva caudal de espermatozoos puede deducirse de la concentración y el volumen presentes en la suspensión utilizada para completar las evaluaciones cualitativas y de la cantidad de espermatozoos recuperados tras triturar u homogeneizar el tejido caudal restante. El recuento debe efectuarse inmediatamente después del sacrificio, en el sublote de machos seleccionados en los grupos tratados con las distintas dosis, salvo que se realicen grabaciones digitales o de vídeo, o se congelen las muestras para su posterior análisis. En estos casos pueden analizarse en primer lugar el lote de control y el tratado con la dosis más alta y, si no se observan efectos relacionados con el tratamiento (por ejemplo, en la cantidad, motilidad o morfología de los espermatozoides), no es preciso analizar los demás lotes. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento en el lote tratado con la dosis más alta, deberán someterse a análisis los lotes tratados con dosis inferiores.

▼B

Debe evaluarse o grabarse en soporte de vídeo inmediatamente después del sacrificio la motilidad de los espermatozoides en el epidídimo o el conducto deferente. Se toma una muestra de esperma evitando al máximo dañar los tejidos y se diluye para estudiar la motilidad mediante métodos aceptables (4). El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles se determina de forma objetiva o subjetiva. Si se realiza un análisis de la motilidad asistido por ordenador (5) (6) (7) (8) (9) (10), la motilidad progresiva se evalúa con arreglo a umbrales de velocidad media de trayectoria y movimiento en línea recta o índice lineal, definidos por el usuario. Si las muestras se graban en vídeo (11) o se graban las imágenes de otra manera en el momento de la autopsia, el análisis posterior puede limitarse a los machos P y F1 del lote de control y del tratado con la dosis más alta, salvo que se hayan observado efectos relacionados con el tratamiento, en cuyo caso habrá que evaluar asimismo los lotes tratados con dosis inferiores. Si no se dispone de imágenes de vídeo ni digitales, se analizarán en la autopsia todas las muestras de todos los lotes tratados.

Se llevará a cabo el análisis morfológico de una muestra de esperma del epidídimo o el conducto deferente. Los espermatozoides (al menos 200 por muestra) se fijan y analizan en preparaciones húmedas (12), y se clasifican entre normales o anómalos. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides incluyen las fusiones, las cabezas aisladas y las cabezas o las colas deformadas. La evaluación ha de efectuarse en el sublote de machos seleccionados de los grupos tratados con las distintas dosis, inmediatamente después del sacrificio o posteriormente a partir de grabaciones de vídeo o digitales. Una vez fijados, los frotis también pueden analizarse en un momento posterior. En estos casos pueden analizarse en primer lugar el lote de control y el tratado con la dosis más alta y, si no se observan efectos relacionados con el tratamiento (sobre la morfología de los espermatozoides, por ejemplo), no es preciso analizar los demás lotes. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento en el lote tratado con la dosis más alta, deberán someterse a análisis los lotes tratados con dosis inferiores.

Si alguno de los parámetros mencionados de evaluación del esperma ya ha sido analizado en un estudio de toxicidad sistémica de 90 días al menos, no es necesario repetir el análisis en el estudio de la toxicidad en dos generaciones. Se recomienda, no obstante, conservar muestras o grabaciones digitales del esperma de la generación P para poder repetir la evaluación, si fuera necesario.

1.5.5. **Descendencia**

Se examinan todas las camadas lo antes posible después del parto (día 0 de la lactancia) para determinar el número y sexo de las crías, la mortinatalidad, el número de nacidos vivos y la presencia de anomalías macroscópicas. Es preferible examinar las crías halladas muertas el día 0, si no están maceradas, para detectar posibles anomalías y determinar la causa de la muerte y, a continuación, conservarlas. Las crías vivas se cuentan y pesan por separado al nacer (día 0 de la lactancia) o el día 1 y luego de forma periódica (por ejemplo, los días 4, 7, 14 y 21 de la lactancia). Se registran las anomalías físicas y las alteraciones del comportamiento de las madres y las crías.

▼B

Se registra el desarrollo físico de la progenie, anotando la ganancia de peso corporal. Otros parámetros físicos (apertura de las orejas y los ojos, erupción de dientes, crecimiento del pelo, etc.) pueden proporcionar información adicional, si bien es preferible emplear esos datos para evaluar la madurez sexual (edad y peso corporal en el momento de la apertura de la vagina o la separación balanoprepucial, etc.) (13). Si no forma parte de otros estudios, se recomienda efectuar la valoración funcional (actividad motriz, funciones sensoriales, ontogenia de los reflejos, por ejemplo) de la progenie F1 antes y/o después del destete, sobre todo por lo que respecta a la maduración sexual. En los descendientes F1 recién destetados y seleccionados para el apareamiento debe determinarse la edad a la que se produzca la apertura de la vagina y la separación balanoprepucial. Si se observa una alteración de la proporción de machos y hembras o de la edad de maduración sexual en la generación F1, debe medirse la distancia anogenital en las crías F2 el día del nacimiento.

Las observaciones funcionales no son obligatorias en los lotes que presenten signos evidentes de toxicidad (disminución significativa de la ganancia de peso, etc.). Si se efectúan exploraciones funcionales, se harán en las crías que no se hayan seleccionado para el apareamiento.

1.5.6. **Autopsia macroscópica**

Justo después del sacrificio o la muerte ocurrida durante el estudio, se someten a examen macroscópico para detectar toda anomalía estructural o cambio patológico todos los animales parentales (P y F1), todas las crías que presenten anomalías externas o signos clínicos y una cría seleccionada al azar de cada sexo y camada de las generaciones F1 y F2. Se prestará especial atención a los órganos reproductores. Deben examinarse y conservarse las crías moribundas que se sacrifiquen por métodos compasivos y las crías muertas, si no están maceradas, para detectar posibles anomalías y establecer la causa de la muerte.

Debe procederse al examen de los úteros de todas las hembras primíparas, sin comprometer la evaluación histopatológica, para detectar la presencia de puntos de implantación y contarlos.

1.5.7. **Pesaje de los órganos**

Tras el sacrificio, se determina el peso corporal de todos los animales parentales P y F1, así como el de los órganos siguientes (los órganos pares se pesarán por separado):

— utero y ovarios,

— testículos y epidídimos (enteros y colas),

— próstata,

— vesículas seminales con glándulas coagulantes y sus líquidos, y próstata (conjunto),

— cerebro, hígado, riñones, bazo, hipófisis, glándula tiroides, glándulas suprarrenales y órganos diana conocidos.

Se determina el peso corporal de las crías F1 y F2 sacrificadas que se hayan seleccionado para la autopsia, así como el peso del cerebro, bazo y timo de una cría seleccionada al azar de cada sexo y camada (véase el apartado 1.5.6).

▼B

Si es posible, los resultados de la autopsia macroscópica y del pesaje de órganos se interpretan a la luz de las observaciones realizadas en otros estudios con dosis repetidas.

1.5.8. **Histopatología**

1.5.8.1. *Animales parentales*

Los siguientes órganos y tejidos de los animales parentales (P y F1), o muestras representativas de estos, se fijan y conservan en un medio apropiado con vistas al examen histopatológico:

— vagina, útero con cuello, y ovarios (conservados en un fijador apropiado),

— un testículo (conservado en líquido de Bouin o un fijador comparable), un epidídimo, las vesículas seminales, la próstata y una glándula coagulante,

— órgano u órganos diana previamente identificados de todos los animales P y F1 seleccionados para el apareamiento.

Debe realizarse un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos antes mencionados de todos los animales P y F1 del lote de control y el lote tratado con la dosis más alta, que se hayan seleccionado para el apareamiento. El examen de los ovarios de las hembras P es facultativo. Deben examinarse, asimismo, los órganos que presenten alteraciones relacionadas con el tratamiento en los lotes tratados con las dosis inferior y media, con objeto de facilitar la determinación de la NOAEL. Además de ello, se someterán a evaluación histopatológica los órganos reproductores de los animales tratados con las dosis inferior y media, en los que se sospeche una disminución de la fertilidad, por ejemplo, los que no se hayan apareado, no hayan concebido, no hayan engendrado o no hayan tenido una progenie sana, o en los que se hayan observado alteraciones del ciclo estrual o de la cantidad, motilidad o morfología de los espermatozoides. Se examinarán todas las lesiones macroscópicas como atrofias o tumores.

Debe efectuarse un examen histopatológico pormenorizado de los testículos (por ejemplo, con líquido de Bouin, inclusión en parafina y cortes transversales de 4-5μm de espesor) para poner de manifiesto los efectos relacionados con el tratamiento como la retención de espermátides, la ausencia de algunas capas o tipos de células germinales, la presencia de células gigantes plurinucleadas o el desprendimiento de células espermatogénicas a la luz de los túbulos seminíferos (14). El examen del epidídimo intacto ha de abarcar la cabeza, el cuerpo y la cola, y puede efectuarse en una sección longitudinal. Se analiza el epidídimo para ver si hay infiltración leucocitaria, cambios en la frecuencia de los tipos celulares, células aberrantes y fagocitosis de espermatozoides. El análisis de los órganos reproductores de los machos puede realizarse mediante coloración con PAS o hematoxilina.

Tras la lactancia, el ovario debe contener folículos primordiales, folículos en crecimiento y grandes cuerpos amarillos de la lactancia. El examen histopatológico debe poner de manifiesto la depleción cualitativa de la población de folículos primordiales. Debe efectuarse una evaluación cuantitativa de los folículos primordiales de las hembras F1; el número de animales, la elección de la sección ovárica y el tamaño de las muestras de secciones han de ser válidas desde el punto de vista estadístico para el método de evaluación empleado. En el examen debe hacerse el recuento de los folículos primordiales, que pueden estar combinados con pequeños folículos en crecimiento, para efectuar la comparación de los ovarios de las hembras de los lotes tratados y del de control (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. Crías destetadas

Se fijan y conservan en un medio adecuado para el posterior examen histopatológico los tejidos que presenten anomalías macroscópicas y los órganos diana de todas las crías que presenten anomalías externas o signos clínicos, así como de la cría seleccionada al azar de cada sexo y camada de las generaciones F1 y F2, que no haya sido seleccionada para el apareamiento. La descripción histopatológica completa de los tejidos conservados se centrará sobre todo en los órganos reproductores.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal por separado y resumirse en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo y cada generación, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras grávidas, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de observaciones de los animales parentales y las crías, los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos debe efectuarse en la fase de diseño del estudio y justificarse. Los modelos estadísticos aplicables a las relaciones dosis-respuesta pueden resultar útiles para analizar los resultados. El informe debe recoger información suficiente sobre el método y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluar y reconstruir el análisis.

2.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones deben evaluarse respecto a los efectos observados, en particular en la autopsia y los exámenes microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación, o la ausencia de relación, entre la dosis de sustancia de ensayo y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, alteración de la fertilidad, anomalías clínicas, alteración de la capacidad de reproducción y del rendimiento de la camada, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico. Los resultados del estudio han de interpretarse teniendo presentes las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de ensayo y, en su caso, los datos toxicocinéticos.

Un ensayo de toxicidad para la reproducción correctamente realizado debe proporcionar una estimación satisfactoria de la dosis sin efecto y poner de manifiesto los efectos adversos sobre la reproducción, el parto, la lactancia y el desarrollo postnatal, en particular el crecimiento y la maduración sexual.

▼B

2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones proporciona información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia durante todas las fases del ciclo de reproducción y, en particular, sobre los parámetros de la reproducción y el desarrollo, crecimiento, maduración y supervivencia de la descendencia. Los resultados del estudio han de interpretarse a la luz de los de los estudios subcrónicos, de desarrollo prenatal, toxicocinéticos y de otro tipo. Los resultados del presente estudio pueden servir para valorar la necesidad de realizar más ensayos con una sustancia química. La validez de la extrapolación de los resultados del estudio al hombre es limitada. Resultan más útiles para determinar las dosis sin efecto y el grado de exposición humana aceptable (20) (21) (22) (23).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas,

— identificación,

— pureza.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa empleada,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, material de nidificación, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos y concentración obtenida,

— estabilidad y homogeneidad del preparado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

▼B

Resultados:

— consumo de alimentos y agua, si se ha medido, rendimiento alimentario (ganancia de peso corporal por gramo de alimentos consumidos) y sustancia de ensayo consumida por los animales P y F1, salvo durante el período de cohabitación y, al menos, el último tercio de la lactancia,

— datos relativos a la absorción (si procede),

— peso corporal de los animales P y F1 seleccionados para el apareamiento,

— datos sobre las camadas y peso de las crías,

— peso corporal en el momento del sacrificio y peso absoluto y relativo de los órganos de los animales parentales,

— naturaleza, gravedad y duración de los signos clínicos (reversibles o no),

— fecha de las muertes sobrevenidas durante el ensayo y animales que han sobrevivido hasta el sacrificio,

— reacción tóxica por sexo y dosis, incluidos los índices de apareamiento, fecundidad, gestación, natalidad, viabilidad y lactancia; el informe debe mencionar las cifras empleadas para calcular los índices,

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie, el crecimiento postnatal, etc.,

— hallazgos de la autopsia,

— descripción detallada de todos los hallazgos histopatológicos,

— número de hembras P y F1 con ciclos normales y duración del ciclo,

— número total de espermatozoides en la cola del epidídimo, porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, porcentaje de espermatozoides de morfología normal y porcentaje de espermatozoides por anomalía detectada,

— tiempo transcurrido hasta el apareamiento, expresado en días,

— duración de la gestación,

— número de implantaciones, cuerpos amarillos, dimensión de la camada,

— número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias,

— número de crías con anomalías macroscópicas y número de crías retrasadas, si se ha determinado,

— parámetros físicos evaluados en las crías y otros datos relativos al desarrollo postnatal; los parámetros físicos evaluados han de justificarse,

— observaciones funcionales realizadas en las crías y los adultos, según proceda,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede,

▼B

Discusión de los resultados,

Conclusiones, incluida la NOAEL en la madre y la progenie.

4. **REFERENCIAS**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, En: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In *Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. y Perreault, S.D. (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. En: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. y M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. y R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarían Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarían Toxicity. En: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. y Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. En: Principies and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, BJ. et al. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. En: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J.A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. En: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. y E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. En: Principies and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). En: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXICOCINÉTICA**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 417 de la OCDE (2010). Se realizan estudios para investigar la toxicocinética de una sustancia problema a fin de obtener la debida información sobre su absorción, distribución, biotransformación (metabolismo) y excreción, relacionar la concentración o la dosis con la toxicidad observada y llegar a comprender los mecanismos toxicológicos. La toxicocinética puede ayudar a entender mejor los estudios toxicológicos demostrando que los animales de experimentación están expuestos de manera sistémica a la sustancia problema y revelando cuáles son las fracciones circulantes (la sustancia original o sus metabolitos). Los parámetros toxicocinéticos básicos que se determinan en estos estudios indican además la capacidad de acumulación de la sustancia problema en los tejidos y órganos, así como el potencial de inducción metabólica tras la exposición a dicha sustancia.

2. Los datos toxicocinéticos pueden ayudar a determinar la idoneidad y relevancia de extrapolar los datos de toxicidad animal a la evaluación del riesgo y/o del peligro para la especie humana. Por otro lado, los estudios toxicocinéticos pueden aportar información muy útil para determinar los niveles posológicos en los estudios de toxicidad (cinética lineal y no lineal), los efectos de la vía de administración, la biodisponibilidad y otras cuestiones relacionadas con el diseño experimental. Algunos de estos datos pueden servir de ayuda en el desarrollo de un modelo toxicocinético basado en la fisiología (PBTK).

3. Los datos toxicocinéticos y de los metabolitos tienen aplicaciones importantes en la medida en que indican posibles toxicidades y modos de acción, así como su relación con el nivel de dosis y la vía de exposición. Además, los datos sobre el metabolismo resultan útiles para evaluar la importancia toxicológica de la exposición a metabolitos de la sustancia problema que son de origen exógeno.

4. Una información toxicocinética adecuada será de ayuda para respaldar la mayor aceptabilidad y aplicabilidad de los modelos de relación estructura-actividad cuantitativa o de extrapolación o agrupación estructural cuando se pretende evaluar la seguridad de la sustancias. Finalmente, los datos cinéticos pueden servir para evaluar la importancia toxicológica de otras investigaciones (*in vivo*/*in vitro*).

5. Mientras no se mencione otra vía de administración (véanse en particular los puntos 74 a 78), el presente método de ensayo es aplicable a la administración oral de la sustancia problema.

CONSIDERACIONES INICIALES

6. Los sistemas normativos imponen diferentes requisitos y necesidades en torno a los criterios de valoración y parámetros que se usan para evaluar la toxicocinética de las diferentes clases de productos químicos (plaguicidas, biocidas, productos químicos industriales, etc.). Contra la que es habitual, este método de ensayo describe el estudio de la toxicocinética, que abarca múltiples determinaciones y criterios de valoración. En el futuro se podrán desarrollar distintos métodos de ensayo y/o documentos de orientación para describir cada criterio de valoración detenidamente y por separado. En la aplicación del presente método de ensayo, los análisis y evaluaciones que se lleven a cabo quedarán especificados por los requisitos y las necesidades de cada sistema normativo en particular.

▼M4

7. Son numerosos los estudios que se podrían realizar para evaluar el comportamiento toxicocinético de una sustancia problema dentro de un marco regulador. Dependiendo de las situaciones o necesidades normativas concretas, sin embargo, no tiene por qué ser obligatorio efectuar todos los estudios posibles para la evaluación de una sustancia. En el diseño de los estudios toxicocinéticos es importante la flexibilidad para tomar en consideración las características de la sustancia química que se pretende estudiar. En algunos casos solo habrá que investigar algunos aspectos determinados para hacer una valoración del riesgo y del peligro asociados a la sustancia problema. En algunas situaciones, se pueden recopilar los datos toxicocinéticos como parte de la evaluación de otros estudios toxicológicos. En otros casos serán necesarios estudios toxicocinéticos complementarios y más exhaustivos, en función de las necesidades normativas o de que surjan nuevos interrogantes al evaluar la sustancia problema.

8. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema y de sus principales metabolitos y análogos, en la que pueden incluirse datos de otros métodos de ensayo pertinentes (estudios *in vivo* e *in vitro,* o evaluaciones *in silico*). En la planificación del estudio y la interpretación de sus resultados pueden ser de ayuda las propiedades fisicoquímicas, como el coeficiente de partición octanol-agua (expresado como log P_{OW}), el pKa, la hidrosolubilidad, la presión de vapor, y el peso molecular de la sustancia química. Estas propiedades se pueden determinar con los procedimientos adecuados que se describen en los correspondientes métodos de ensayo.

LIMITACIONES

9. El presente método de ensayo no ha sido diseñado para contemplar circunstancias especiales, como es el caso de las hembras grávidas o lactantes y de su progenie, ni para evaluar los residuos potenciales en los animales productores de alimentos que han estado expuestos. Sin embargo, los datos obtenidos de un estudio B.36 pueden aportar una valiosa información de base para el diseño de investigaciones específicas en este sentido. El presente método de ensayo no está destinado a la investigación de nanomateriales. El informe de una revisión preliminar de las directrices de ensayo (TG) de la OCDE para determinar su aplicabilidad a los nanomateriales indica que la TG 417 (equivalente a este método de ensayo B.36) no siempre es aplicable a los nanomateriales (1).

DEFINICIONES

10. Las definiciones de términos relacionados con este método de ensayo se pueden consultar en el apéndice.

CONSIDERACIONES SOBRE EL BIENESTAR ANIMAL

11. Se ofrecen indicaciones sobre el trato compasivo de los animales en el documento de orientación (GD) nº 19 de la OCDE (2). Se recomienda consultar dicho GD en relación con todos los estudios *in vivo* e *in vitro* descritos en este método de ensayo.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Estudios piloto

12. Se recomienda y se insta a realizar estudios piloto para la selección de los parámetros experimentales de los estudios toxicocinéticos (metabolismo, balance de masas, procedimientos analíticos, determinación del intervalo de dosis, exhalación de CO_2, etc.). La caracterización de algunos de estos parámetros puede no necesitar el uso de sustancias marcadas radiactivamente.

▼M4

Selección de los animales

Especie

13. La especie animal (y cepa) empleada en la investigación toxicocinética será, preferiblemente, la misma que en otros estudios toxicológicos efectuados con la sustancia química de interés. Normalmente se prefiere la rata, por cuanto se utiliza ampliamente en los estudios toxicológicos. El uso complementario de otras especies puede estar justificado si los estudios críticos de toxicología aportan pruebas de toxicidad importante en estas especies, o si la toxicidad/toxicocinética en estas resulta más relevante para la especie humana. Se justificará la elección de la especie animal y de la cepa.

14. Mientras no se indique lo contrario, el presente método de ensayo se refiere a la rata como especie experimental. Si se usan otras especies experimentales es posible que deban modificarse determinados aspectos metodológicos.

Edad y cepa

15. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos (normalmente de 6-12 semanas en el momento de la administración; véanse también los puntos 13 y 14). Se justificará el uso de animales que no sean adultos jóvenes. Todos los animales deben tener edades parecidas al principio del estudio. El peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior a ± 20 % del valor medio del grupo experimental. Idealmente, la cepa empleada debe ser la misma que se haya usado para obtener la base de datos toxicológicos de la sustancia problema.

Número y sexo de los animales

16. Por cada nivel de dosis investigado se emplearán como mínimo cuatro animales de un sexo. Se justificará la elección del sexo de los animales empleados. Se planteará usar animales de ambos sexos (4 machos y 4 hembras) si hay indicios para sospechar variaciones importantes de la toxicidad en función del sexo.

Alojamiento y alimentación

17. Como norma, los animales deben ser enjaulados de manera individual durante el período de estudio. El enjaulamiento en grupo puede estar justificado en circunstancias especiales. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C) y a una humedad relativa del 30-70 %. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Sustancia problema

18. Se utilizará una sustancia química marcada radiactivamente con ^{14}C para investigar todos los aspectos del estudio relacionados con el balance de masas y la identificación de los metabolitos; ahora bien, si se puede demostrar que:

— es posible evaluar adecuadamente el balance de masas y la identificación de los metabolitos empleando la sustancia problema sin marcar,

— la especificidad y sensibilidad analíticas del método usado con la sustancia problema no radiactiva son iguales o superiores a las que se obtendrían con la sustancia química radiomarcada,

▼M4

entonces no será necesario marcar radiactivamente la sustancia problema. Por lo demás, se pueden usar otros isótopos radiactivos y estables, particularmente si son responsables o forman parte de la fracción tóxica de la sustancia problema. Cuando sea posible, el marcador radiactivo se ubicará en una fracción nuclear de la molécula metabólicamente estable (no intercambiable, no eliminada metabólicamente en forma de CO_2 y que no pase a formar parte de la reserva de moléculas de un solo átomo de carbono del organismo). Puede ser necesario el radiomarcado de distintos sitios o regiones específicas de la molécula para seguir el destino metabólico de la sustancia problema.

19. Las sustancias problema, radiomarcadas o no, se analizarán con los métodos adecuados para establecer su pureza y su identidad. La pureza radiactiva de la sustancia problema radiomarcada debe ser la máxima posible para esa sustancia en particular (lo ideal es que supere el 95 %) y se procurará por todos los medios identificar los niveles de impurezas del 2 % o superiores. Se documentarán la pureza, la identidad y los porcentajes de impurezas que se hayan detectado. Cada marco regulador podrá proporcionar más indicaciones que orienten en la definición y las especificaciones de las sustancias que son mezclas, así como en la elección de métodos para la determinación de la pureza.

Selección de la dosis

Estudio piloto

20. Generalmente es suficiente una dosis oral única para realizar el estudio piloto. La dosis debe ser atóxica, pero lo bastante elevada para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma) y el cumplimiento de la finalidad enunciada del estudio piloto, según se expone en el punto 12 del presente método de ensayo.

Estudios principales

21. En los estudios principales se prefiere usar como mínimo dos dosis, por cuanto la información derivada de al menos dos grupos posológicos permite establecer los niveles de dosis en otros estudios de toxicidad y contribuye a evaluar la relación dosis-respuesta observada en los estudios de toxicidad previos.

22. Cuando se administran dos dosis, ambas deben ser lo bastante elevadas para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma). En la selección de las dosis se tendrá en cuenta la información de los estudios de toxicidad previos. Cuando no se disponga de tal información (de estudios de toxicidad oral aguda que hayan documentado los signos clínicos de toxicidad, o de estudios de administración continuada), se podrá considerar para la dosis más elevada un valor por debajo de la DL_{50} (por las vías oral y cutánea) o la CL_{50} (por inhalación) estimadas, o bien por debajo del límite inferior del intervalo de toxicidad aguda estimado. La dosis más baja será una fracción de la más elevada.

23. Cuando solo se investiga una dosis, lo ideal es que sea lo bastante elevada para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma) sin provocar toxicidad aparente. Se justificarán los motivos de no incluir un segundo nivel posológico.

24. Cuando sea necesario establecer el efecto de la posología sobre los procesos cinéticos, puede ser que no basten dos dosis, y al menos una de ellas será lo bastante elevada para saturar dichos procesos. Si el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) no es lineal entre dos niveles de dosis empleados en el estudio principal, ello indica con bastante certeza que se está produciendo la saturación de uno o más procesos cinéticos en algún punto entre los dos niveles de dosificación.

▼M4

25. Cuando la sustancia problema posea escasa toxicidad, se empleará una dosis máxima de 1 000 mg/kg peso corporal por las vías oral y cutánea (si la vía es inhalatoria, consúltese el capítulo B.2 del presente anexo; típicamente, esta dosis no debe superar los 2 mg/l). En función de las necesidades normativas y de las características específicas de la sustancia, puede hacer falta una dosis más elevada. Se justificará siempre la selección de la dosis.

26. La toxicocinética de dosis única y los datos de distribución en los tejidos pueden ser suficientes para determinar el potencial de acumulación y de persistencia. Sin embargo, en algunas circunstancias se requiere la administración de dosis repetidas: 1) para investigar mejor el potencial de acumulación y de persistencia o los cambios de toxicocinética (caso de la inducción o inhibición enzimáticas), o 2) cuando así lo exige el marco regulador de aplicación. En los estudios de administración continuada, si bien suele bastar con la administración continuada de dosis bajas, determinadas circunstancias imponen además la administración continuada de dosis elevadas (véase también el punto 57).

Administración de la sustancia problema

27. La sustancia problema se debe disolver o suspender de manera homogénea en el mismo vehículo que se haya empleado en los estudios de toxicidad oral con administración por sonda gástrica, si se dispone de esa información. Se justificará la elección del vehículo. En el diseño del estudio se tendrán en cuenta la elección del vehículo y el volumen de administración. El método habitual de administración es por sonda gástrica; no obstante, en determinadas situaciones puede resultar ventajosa la administración del producto en una cápsula de gelatina o mezclado con el alimento (se justificará en ambos casos). Se documentará la verificación de la dosis real que se administra a cada animal.

28. El volumen máximo de líquido que se puede administrar de una vez por sonda gástrica depende del tamaño de los animales experimentales, del tipo de vehículo y de si se priva a los animales de alimento antes de administrarles la sustancia problema. Se justificarán los motivos de alimentar a los animales o de restringir la comida antes de administrar la dosis. Normalmente, el volumen será lo más bajo posible, se trate de vehículos acuosos o no. En el caso de los roedores, el volumen de administración no debe exceder generalmente de 10 ml/kg peso corporal. Cuando se trata de sustancias químicas más lipófilas, el volumen de vehículo puede ser en principio de 4 ml/kg peso corporal. Si la administración es continuada, de modo que esté contraindicado el ayuno diario, se contemplará un volumen menor de administración (2-4 ml/kg peso corporal). Siempre que sea posible se procurará utilizar un volumen de dosis coherente con el administrado en otros estudios realizados con la misma sustancia introducida por sonda gástrica.

29. Con el fin de establecer la biodisponibilidad o la absorción oral relativa, se puede recurrir a la administración intravenosa (i.v.) de la sustancia problema y a la determinación de sus concentraciones en la sangre o las excretas. En el estudio i.v. se administra, en un vehículo adecuado, una dosis única (que suele ser equivalente pero no superior a la dosis oral más baja; véase la selección de la dosis) de la sustancia problema. El producto se administrará en un volumen adecuado (por ejemplo, 1 ml/kg peso corporal), en el lugar de aplicación establecido, como mínimo a 4 animales del sexo seleccionado para la investigación (pueden ser ambos sexos, siempre que se justifique; véase el punto 16). Para la administración i.v. de la sustancia problema se requiere la suspensión o disolución completa de la dosis preparada. El vehículo de la administración i.v. no debe afectar a la circulación ni a la

▼M4

integridad de la sangre. Si la sustancia problema se administra en infusión, se documentará la velocidad de la misma y se normalizará en todos los animales siempre y cuando se emplee una bomba. Se empleará anestesia cuando se vaya a canular (ya sea para la administración de la sustancia química o para tomar muestras de sangre) la vena yugular o la arteria femoral. Se considerará detenidamente el tipo de anestesia usado, ya que puede influir en la toxicocinética. Se permitirá a los animales recuperarse debidamente antes de administrarles la sustancia problema y el vehículo.

30. Con determinadas sustancias se pueden emplear otras vías de administración, como la cutánea o la inhalatoria (véanse los puntos 74-78), dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y del uso o del grado de exposición humana previsibles.

Mediciones

Balance de masas

31. El balance de masas viene determinado por la suma del porcentaje de la dosis (radiactiva) administrada que se excreta en la orina, las heces y el aire espirado y el porcentaje que está presente en los tejidos, el resto del cuerpo y los líquidos de lavado de la jaula (véase el punto 46). En general se considera aceptable una recuperación total de la dosis (radiactiva) administrada > 90 %.

Absorción

32. Es posible hacer una estimación inicial de la absorción excluyendo del balance de masas el porcentaje de la dosis presente en el aparato digestivo y/o en las heces. En el punto 33 se puede consultar el cálculo del porcentaje de absorción. En los puntos 44-49 se describe la investigación de las excretas. Cuando el estudio del balance de masas no permita establecer la magnitud exacta de la absorción que sigue a la administración oral (por ejemplo, cuando se detecte en las heces más del 20 % de la dosis administrada), pueden ser necesarias otras investigaciones. Estas pueden ser de dos tipos: 1) administración oral de la sustancia problema y medición de su contenido en la bilis, o 2) administración oral o i.v. de la sustancia problema y medición, por cada una de las dos vías, de su contenido neto en orina + aire espirado + cuerpo. En los dos tipos de diseño, la medida de la radiactividad se efectúa como un método subsidiario del análisis químico específico de la sustancia problema y sus metabolitos.

33. En los estudios de excreción biliar la vía de administración tradicional es la oral. En este tipo de estudios, se canulan los conductos biliares de al menos 4 animales del sexo seleccionado (o de ambos sexos, siempre que se justifique) y se les administra una dosis única de la sustancia problema. Después de la administración se supervisa la excreción de la radiactividad/sustancia problema en la bilis durante el tiempo necesario para calcular el porcentaje de la dosis administrada que se excreta por esta vía, el cual se aplica directamente al cálculo de la absorción oral según la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de absorciún} = \begin{array}{l}(\text{cantidad presente en bilis} + \text{orina} + \text{ aire espirado} \\ + \text{ cuerpo salvo el contenido del aparato digestivo}) \\ /\text{cantidad administrada} \times 100\end{array}$$

34. Con determinadas sustancias se produce la secreción directa por la mucosa intestinal de la dosis absorbida. En tales casos, la medición del porcentaje de dosis en heces después de la administración oral en ratas sometidas a canulación del conducto biliar no se considera representativa de la dosis no absorbida. Se recomienda que, cuando sea previsible la secreción intestinal, el cálculo del porcentaje de dosis absorbida se base en una comparación de la dosis excretada después de las administraciones oral e i.v. (ratas con el conducto biliar intacto o canulado; véase el punto 35). Se recomienda también que, cuando se juzgue necesario cuantificar la secreción intestinal, se mida la excreción que sigue a la administración de una dosis i.v. en ratas con el conducto biliar canulado.

▼M4

Biodisponibilidad

35. La biodisponibilidad se puede determinar por la cinética plasmática/sanguínea medida en los grupos de administración oral e i.v., según se describe en los puntos 50-52, mediante análisis químico específico de la sustancia problema y de sus metabolitos principales, de modo que no se requiere el marcado radiactivo. El cálculo de la biodisponibilidad (F) de la sustancia problema o de sus metabolitos principales se puede hacer según la fórmula siguiente:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dosis_{IV}/Dosis_{exp})$$

donde AUC es el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo, y exp es la vía de administración experimental (oral, cutánea o inhalatoria).

36. En la evaluación del riesgo de efectos sistémicos, en general se prefiere calcular la biodisponibilidad del componente tóxico antes que el porcentaje de absorción cuando se comparan las concentraciones sistémicas observadas en animales experimentales con los datos análogos de biovigilancia obtenidos en estudios de exposición ocupacional. La situación puede hacerse más compleja si las dosis se sitúan en el intervalo de no linealidad, por lo que conviene que el cribado toxicocinético determine las dosis del intervalo lineal.

Distribución en los tejidos

37. El conocimiento de la distribución en los tejidos de una sustancia y de sus metabolitos es importante para la identificación de los tejidos diana, la comprensión de los mecanismos que subyacen a la toxicidad, y la calibración del potencial de acumulación y persistencia que tienen la sustancia y sus metabolitos. El porcentaje de la dosis (radiactiva) total presente en los tejidos y en el resto del cuerpo se medirá como mínimo al concluir el ensayo de excreción (habitualmente, hasta 7 días después de administrar la dosis, o menos dependiendo del comportamiento de la sustancia concreta). Cuando no se detecte la sustancia problema en los tejidos al concluir el estudio (por ejemplo, porque tenga una semivida corta y se haya eliminado antes), conviene ser precavido para no malinterpretar los datos. En estas situaciones, se investigará la distribución en los tejidos en un momento que coincida con el pico de concentración plasmática/sanguínea ($T_{máx}$) de la sustancia (y/o de sus metabolitos) o con la tasa máxima de excreción urinaria, según convenga (véase el punto 38). Puede ser necesario, además, tomar muestras de tejido en otros momentos para determinar la distribución de la sustancia problema y/o sus metabolitos, para evaluar (cuando proceda) la dependencia del tiempo, para ayudar a establecer el balance de masas o porque así lo estipule la autoridad competente. Se tomarán muestras de los tejidos siguientes: adiposo, hígado, aparato digestivo, riñón, bazo, sangre completa, resto del cuerpo, órganos diana y otros tejidos (tiroides, eritrocitos, órganos reproductores, piel y ojos, especialmente en animales pigmentados) que puedan revestir importancia para la evaluación toxicológica de la sustancia problema. Se contemplará el análisis de otros tejidos en los mismos tiempos de medición con el fin de maximizar el uso de los animales, pero también en el caso de que se observe toxicidad en un órgano diana en los estudios de toxicidad crónica o subcrónica. Se documentará además la concentración (radiactiva) residual y la relación de concentraciones en tejidos/plasma (sangre).

38. Puede ser también necesario, o requerido por la autoridad competente, el estudio de la distribución en los tejidos en un momento que coincida con el pico de concentración plasmática/sanguínea ($T_{máx}$) o con la tasa máxima de excreción urinaria, determinada en los correspondientes ensayos de cinética plasmática/sanguínea o de excreción. Tal información puede ser útil para esclarecer la toxicidad y el potencial de acumulación y persistencia de la sustancia problema y sus metabolitos. Se justificará la selección de las muestras de tejido; en general, las muestras para análisis deben ser idénticas a las ya mencionadas (véase el punto 37).

▼M4

39. En los estudios de distribución en los tejidos, la cuantificación de la radiactividad se puede hacer mediante disección de órganos, homogeneización, combustión y/o solubilización, seguidas de recuento de centelleo líquido (LSC) de los residuos retenidos. Algunas técnicas que se encuentran en distintas fases de desarrollo, como la autorradiografía cuantitativa del cuerpo entero y la autorradiografía microscópica de receptores, pueden ser útiles para medir la distribución de una sustancia problema en los órganos y los tejidos (3) (4).

40. Cuando la vía de exposición es distinta de la oral, se deben tomar y analizar muestras de tejidos específicos, como son los pulmones en los estudios de inhalación y la piel en los estudios dermatológicos. Véanse los puntos 74 a 78.

Metabolismo

41. Se tomarán muestras de excretas (y de plasma, según proceda) para la identificación y la cuantificación de la sustancia problema intacta y de sus metabolitos, tal como se describe en los puntos 44-49. Se acepta la agrupación de las excretas para facilitar la identificación metabólica en un grupo posológico dado. Se recomienda hacer un perfil de los metabolitos a intervalos de tiempo determinados. Si la carencia de muestras o de radiactividad lo impide, se admite la agrupación de la orina y las heces recogidas en distintos momentos, pero nunca es aceptable la agrupación entre distintos sexos o grupos de dosis. Se emplearán los oportunos métodos cualitativos y cuantitativos para valorar la radiactividad en orina, en heces y espirada, y si procede en la bilis de los animales tratados.

42. Se procurará por todos los medios identificar todos los metabolitos con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada y proporcionar un esquema metabólico de la sustancia problema. Deberán identificarse las sustancias problema que se hayan detectado en las excretas con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada. Por identificación se entiende la determinación estructural exacta de sus componentes. Habitualmente, la identificación se acomete mediante co-cromatografía del metabolito y de sustancias patrón conocidas aplicando dos sistemas no afines, o mediante técnicas que permiten una identificación estructural positiva como son la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear (RMN), etc. En el caso de la co-cromatografía, las técnicas cromatográficas que emplean la misma fase estacionaria con dos sistemas de solvente distintos no se consideran un método adecuado de doble verificación de la identidad del metabolito, puesto que no son independientes. La identificación mediante co-cromatografía debe hacerse con dos sistemas no afines, analíticamente independientes, como son la cromatografía en capa fina (TLC) de fase normal e inversa y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La confirmación por medios espectroscópicos no será necesaria, siempre que la separación cromatográfica sea de calidad aceptable. Se puede llegar también a una identificación inequívoca con métodos que proporcionan información estructural, tales como: cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS) o cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) y espectroscopia de RMN.

43. Cuando no sea posible la identificación de los metabolitos con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada, se agregará una justificación o explicación en el informe final. Para llegar a una comprensión mejor de la vía metabólica que permita evaluar el riesgo o factor de riesgo que supone la sustancia problema, puede ser conveniente identificar los metabolitos con un contenido inferior al 5 % de la dosis administrada. Siempre que sea posible se aportará la confirmación estructural. Puede incluirse el perfil en plasma, sangre u otros tejidos.

▼M4

Excreción

44. La tasa y la velocidad de excreción de la dosis administrada se determinará midiendo el porcentaje recuperado de la dosis (radiactiva) en orina, heces y aire espirado. Estos datos ayudarán, entre otras cosas, a establecer el balance de masas. A intervalos adecuados se determinarán las cantidades de sustancia problema (radiactividad) eliminada en orina, heces y aire espirado (véanse los puntos 47-49). Los ensayos de administración continuada deben diseñarse correctamente con el fin de recopilar datos de excreción que cumplan los objetivos descritos en el punto 26. Así será posible la comparación con los ensayos de dosis única.

45. Si un estudio piloto ha demostrado (de conformidad con el punto 49) que no se excreta en el aire espirado una cantidad importante de la sustancia problema (radiactividad), no será necesario tomar muestras de aire espirado en el estudio definitivo.

46. Cada animal se ubicará en una unidad metabólica aparte para la recogida de las excretas (orina, heces y aire espirado). Al concluir cada período de recogida (véanse los puntos 47-49), las unidades metabólicas se lavan con el disolvente adecuado (lo que se llama "lavado de la jaula") para garantizar la máxima recuperación de la sustancia problema (radiactividad). La recogida de las excretas concluirá al cabo de 7 días o cuando se haya recuperado al menos el 90 % de la dosis administrada, lo que ocurra antes.

47. La cantidad total de sustancia problema (radiactividad) en la orina se determinará como mínimo en dos momentos del día 1 de recogida, uno de ellos a las 24 horas de la administración, y en lo sucesivo diariamente hasta la conclusión del estudio. Se recomienda establecer más de dos momentos de muestreo en el día 1 (por ejemplo, a las 6, 12 y 24 horas). Se analizarán los resultados de los estudios piloto para obtener información sobre otros momentos, complementarios o alternativos, de recogida. Se justificarán debidamente los programas de recogida de muestras.

48. La cantidad total de sustancia problema (radiactividad) en las heces se determinará diariamente, comenzando a las 24 horas de la administración y hasta la conclusión del estudio, salvo que los estudios piloto indiquen otros momentos, complementarios o alternativos, de recogida. Se justificará debidamente cualquier otro programa de recogida de muestras.

49. En un experimento concreto se podrá interrumpir la recogida del CO_2 y de otras sustancias volátiles en el aire espirado cuando en el mismo se detecte menos del 1 % de la dosis administrada durante un período de recogida de 24 horas.

Estudios cinéticos

Cinética plasmática/sanguínea

50. La finalidad de estos estudios es hacer estimaciones de los principales parámetros toxicocinéticos [$C_{máx}$, $T_{máx}$, semivida ($t_{1/2}$), AUC] de la sustancia problema. Estos estudios se pueden realizar con una sola dosis o, más frecuentemente, con dos o más dosis. La posología dependerá de la naturaleza y del objeto de la investigación. Los datos cinéticos son a veces necesarios para resolver cuestiones como la biodisponibilidad de la sustancia problema o evaluar el efecto de la dosis sobre el aclaramiento (por ejemplo, evaluar si el aclaramiento se satura de manera dependiente de la dosis).

51. En este tipo de estudios deben emplearse como mínimo 4 animales de un mismo sexo por cada grupo de dosis. Se justificará la elección del sexo de los animales empleados. Se planteará usar animales de ambos sexos (4 machos y 4 hembras) si hay indicios para sospechar variaciones importantes de la toxicidad en función del sexo.

▼M4

52. Tras la administración de la sustancia problema (radiomarcada), se tomarán muestras de sangre de cada animal en los momentos indicados y con una metodología de muestreo apropiada. El volumen y el número de las muestras de sangre que se pueden tomar de cada animal pueden estar limitados por los posibles efectos del muestreo reiterado sobre la salud y fisiología de los animales o sobre la sensibilidad del método analítico. Se analizarán las muestras de cada animal por separado. En algunas circunstancias (por ejemplo, caracterización de los metabolitos), puede estar indicado agrupar las muestras de varios animales. Las muestras agrupadas se identificarán claramente y se justificará el motivo de agruparlas. Cuando se usan sustancias químicas radiomarcadas, puede estar indicado el análisis de la radiactividad total presente. En tal caso se analizará la radiactividad total en la sangre completa y en el plasma, o bien en el plasma y los eritrocitos, para poder calcular el cociente de distribución sangre/plasma. En otras situaciones se precisan estudios más específicos, que exigen la identificación del compuesto parental y/o de sus metabolitos o del grado de afinidad por las proteínas.

Cinética en otros tejidos

53. La finalidad de estos estudios es conocer cómo evolucionan con el tiempo las concentraciones de la sustancia problema en los diversos tejidos, para dar respuesta a interrogantes como el mecanismo de la acción tóxica, la bioacumulación y la biopersistencia. La selección de los tejidos y de la frecuencia de medición dependerá del aspecto concreto que se pretenda investigar y de la base de datos toxicológicos de la sustancia estudiada. Para el diseño de estos estudios cinéticos complementarios se tendrá en cuenta la información acumulada, tal como se describe en los puntos 37-40. En estos estudios la administración puede ser única o continuada. Se justificará detalladamente el método elegido.

54. Los motivos para efectuar estudios cinéticos en otros tejidos pueden ser los siguientes:

— que haya indicios de una semivida prolongada en sangre, con posible acumulación de la sustancia problema en varios tejidos, o

— que interese comprobar si se ha alcanzado un estado estacionario en tejidos concretos (por ejemplo, en los estudios de administración continuada, aunque se haya alcanzado un estado estacionario aparente en sangre, puede ser interesante determinar si se ha alcanzado ese mismo estado estacionario en los tejidos diana).

55. En este tipo de investigación cinética, se administra una dosis oral apropiada de la sustancia problema como mínimo a 4 animales por cada dosis y tiempo de medición, y se supervisa la distribución en los tejidos seleccionados a lo largo del tiempo. Se puede usar un solo sexo de animales, salvo que haya indicios de toxicidad asociada al sexo. Se analizará la radiactividad total o bien el compuesto parental y/o sus metabolitos, dependiendo del aspecto que se pretenda investigar. La distribución en los tejidos se evaluará con las técnicas apropiadas.

Inducción e inhibición enzimáticas

56. El estudio de los posibles efectos de inducción o inhibición enzimáticas o de la biotransformación de la sustancia problema puede ser necesario en alguna de las siguientes situaciones:

1) hay indicios de una relación entre la biotransformación de la sustancia problema y el aumento de la toxicidad;

2) los datos de toxicidad disponibles indican una relación no lineal entre la dosis y el metabolismo;

▼M4

3) los resultados de los estudios de identificación de metabolitos apuntan a la formación de un metabolito potencialmente tóxico por una vía metabólica inducida por la sustancia problema;

4) para hallar explicación a efectos hipotéticamente vinculados a fenómenos de inducción enzimática;

5) si se observan alteraciones toxicológicamente significativas en el perfil metabólico de la sustancia problema, ya sea en ensayos *in vitro* o *in vivo* realizados con diferentes especies o condiciones experimentales, puede estar indicada la caracterización de las enzimas que intervienen (por ejemplo, enzimas de fase I como las isoenzimas del sistema de la monooxigenasa dependiente del citocromo P450, enzimas de fase II como el sistema enzimático de la sulfotransferasa o de la uridina-difosfato-glucuronosiltransferasa, u otras). Tal información podría ser de ayuda para evaluar la pertinencia de las extrapolaciones entre especies.

57. Deben emplearse protocolos experimentales adecuados para evaluar las alteraciones toxicocinéticas relacionadas con la sustancia problema, debidamente validados y justificados. Ejemplos de tales protocolos serían la administración continuada de una sustancia problema sin marcar, seguida de una dosis radiomarcada el día 14, o la administración continuada de una sustancia radiomarcada con muestreos los días 1, 7 y 14 para determinar los perfiles metabólicos. La administración continuada de una sustancia radiomarcada también puede aportar datos sobre su bioacumulación (véase el punto 26).

OTROS PLANTEAMIENTOS

58. Otros planteamientos complementarios de los estudios *in vivo* que se describen en el presente método de ensayo pueden proporcionar informaciones útiles sobre la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de una sustancia problema en ciertas especies.

Uso de la información *in vitro*

59. Algunos aspectos del metabolismo de la sustancia problema se pueden investigar en ensayos *in vitro* con la metodología adecuada. Para el estudio de los posibles metabolitos se pueden emplear aislados o cultivos recientes de hepatocitos y fracciones subcelulares (por ejemplo, microsomas y citosol o fracción S9) de hígado. El metabolismo local del órgano diana, como el pulmón, puede ser de interés para la evaluación del riesgo. A este efecto resultan útiles las fracciones microsomales de los tejidos diana. Las investigaciones con microsomas pueden ayudar a entender las posibles diferencias en función del sexo y de la edad y a caracterizar los parámetros enzimáticos (K_m y $V_{máx}$) de interés para evaluar la dependencia del metabolismo en función de la dosis o los niveles de exposición. Además, las investigaciones con microsomas pueden ayudar a identificar las enzimas microsomales específicas que intervienen en el metabolismo de la sustancia problema, lo que tendría relevancia de cara a la extrapolación entre especies (véase también el punto 56). La capacidad de inducir biotransformación se puede investigar también en fracciones subcelulares de hígado (por ejemplo, microsomas y citosol) de animales previamente tratados con la sustancia de interés, *in vitro* en estudios de inducción de hepatocitos o a partir de líneas celulares específicas que expresen las enzimas relevantes. En circunstancias especiales y en las condiciones adecuadas, se podría contemplar el uso de fracciones subcelulares de tejidos humanos para investigar las posibles diferencias de biotransformación entre distintas especies. Los resultados de las investigaciones *in vitro* pueden ser útiles para el desarrollo de modelos toxicocinéticos basados en la fisiología (PBTK) (5).

▼M4

60. Los estudios de absorción dérmica *in vitro* pueden proporcionar una información suplementaria para caracterizar la absorción (6).

61. Es posible usar cultivos celulares primarios de hepatocitos y extensiones de tejido fresco para hacer investigaciones similares a las realizadas con microsomas hepáticos. En ciertos casos es posible resolver cuestiones concretas empleando líneas celulares con una expresión definida de la enzima relevante o producidas mediante ingeniería genética. En otros casos resultará útil el estudio *in vitro* de la inhibición y la inducción de las isoenzimas del citocromo P450 (CYP1A1, 2E1, 1A2, y otras) y/o de las enzimas de fase II provocada por el compuesto parental. La información obtenida puede ser aplicable a otros compuestos estructuralmente afines.

Uso de los datos toxicocinéticos de los estudios de toxicidad como información complementaria

62. El análisis de las muestras de sangre, tejidos o excretas obtenidas en el transcurso de cualesquiera otros estudios de toxicidad pueden proporcionar datos sobre la biodisponibilidad, la variación de las concentraciones plasmáticas con el tiempo (AUC, $C_{máx}$), la capacidad de bioacumulación, la velocidad de eliminación y los cambios metabólicos y cinéticos dependientes de la edad y del sexo.

63. Se puede enfocar el diseño del estudio para intentar dar respuesta a cuestiones relacionadas con los niveles de dosis más elevadas, como son: la saturación de las vías de absorción, biotransformación o excreción; la intervención de nuevas vías metabólicas, y la limitación de los metabolitos tóxicos.

64. La evaluación de los factores de riesgo puede hacerse extensiva a cuestiones como:

— el cambio de la sensibilidad con la edad, debido a variaciones en el estado de la barrera hematoencefálica, la función renal o la capacidad destoxificadora del hígado,

— el cambio de la sensibilidad con las subpoblaciones, debido a diferencias en la capacidad de biotransformación o a otras variaciones toxicocinéticas,

— el grado de exposición del feto, por el paso de las sustancias a través de la placenta, o del recién nacido por transmisión con la leche materna.

Aplicación de los modelos toxicocinéticos

65. Los modelos toxicocinéticos son aplicables a diversos aspectos de la evaluación del riesgo y de los factores de riesgo, como cuando se trata de prever la exposición sistémica y la concentración alcanzada en los tejidos internos. Permiten valorar también aspectos concretos del modo de acción y constituyen una base para la extrapolación entre especies y el esclarecimiento de las vías de exposición, las pautas de administración y la evaluación del riesgo humano. En el desarrollo de modelos PBTK para una sustancia problema y una especie determinadas son de ayuda los siguientes datos: 1) coeficientes de reparto; 2) constantes bioquímicas y parámetros fisiológicos; 3) parámetros específicos de la vía de absorción, y 4) datos cinéticos *in vivo* para la evaluación del modelo [por ejemplo, valores de aclaramiento en las vías de excreción principales (> 10 %), K_m y $V_{máx}$ para valorar el metabolismo]. Los datos experimentales que se tomen para el desarrollo del modelo han de basarse en métodos científicamente reconocidos, y los resultados del modelo deben ser validados. A menudo se determinan los parámetros específicos de la sustancia problema y de la especie, como la velocidad de absorción, el coeficiente de reparto entre sangre y tejidos y las constantes metabólicas, para facilitar el desarrollo de modelos no compartimentales o basados en la fisiología (7).

▼M4

DATOS E INFORME

66. Es recomendable que el informe del estudio vaya acompañado de un índice.

Cuerpo principal del informe

67. El cuerpo principal del informe debe contener la información que se recoge en este método de ensayo, organizada en secciones y puntos de la manera siguiente:

Resumen

68. Esta sección del informe debe contener un resumen del diseño del estudio y una descripción de los métodos empleados. Debe destacar así mismo los principales resultados referentes al balance de masas, la naturaleza y magnitud de los metabolitos, los residuos en tejidos, la velocidad de eliminación, la capacidad de bioacumulación, las diferencias en función del sexo, etc. El resumen se presentará con el detalle suficiente para permitir la evaluación de los resultados.

Introducción

69. Esta sección del informe debe contener los objetivos del estudio, su justificación y diseño, así como cualquier información histórica o de referencia pertinente.

Material y métodos

70. En esta sección se hará una descripción pormenorizada de toda la información pertinente.

a) Sustancia problema

Esta subsección debe facilitar la identificación de la sustancia problema: denominación química, estructura molecular, determinación cualitativa y cuantitativa de la composición química, pureza y, siempre que sea posible, tipo de impurezas y sus cantidades. Debe contener además información sobre propiedades fisicoquímicas tales como el estado físico, color, solubilidad macroscópica o coeficiente de partición, estabilidad y, en su caso, corrosividad. Cuando proceda, se facilitará información acerca de los isómeros. Si se trata de una sustancia radiomarcada, esta subsección debe contener además los siguientes datos: tipo de radionucleido, posición del marcador, actividad específica y pureza radioquímica.

Se indicará el tipo o la descripción de cualesquiera vehículo, diluyentes, agentes de suspensión, emulsionantes y demás productos empleados para la administración de la sustancia problema.

b) Animales de ensayo

Esta subsección debe contener la información referente a los animales de ensayo, como la selección y justificación de la especie, cepa y edad al principio del estudio, el sexo y el peso corporal, el estado de salud y la zootecnia.

c) Métodos

Esta subsección debe contener los pormenores del diseño del estudio y la metodología empleada. Debe incluir una descripción de:

1) la justificación de cualquier cambio de la vía o de las condiciones de exposición, cuando proceda;

▼M4

2) la justificación para seleccionar los niveles o concentraciones de las dosis;

3) una descripción de los estudios piloto utilizados en el diseño experimental de los estudios de seguimiento, cuando proceda; se presentarán los datos que respalden el estudio piloto;

4) se describirá la forma de preparar la disolución de la dosis y, en su caso, el tipo de disolvente o vehículo;

5) el número de lotes o grupos de tratamiento y el número de animales por grupo;

6) las concentraciones y el volumen de las dosis (y la actividad específica de la dosis cuando sea radiactiva);

7) la(s) vía(s) y los métodos de administración;

8) la frecuencia de administración;

9) el período de ayuno (en su caso);

10) la radiactividad total por animal;

11) la manipulación de los animales;

12) la recogida y el tratamiento de las muestras;

13) los métodos analíticos aplicados a la separación, cuantificación e identificación de los metabolitos;

14) el límite de detección de los métodos empleados;

15) otros procedimientos y medidas experimentales empleados (entre ellos, la validación de los métodos de análisis de los metabolitos).

d) Análisis estadístico

Si se hace un análisis estadístico de los resultados, el informe debe recoger información suficiente sobre el método y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluar y reconstruir el análisis.

En el caso de estudios de modelización de sistemas como el PBTK, la presentación de los modelos debe comprender una descripción de los mismos que permita su reconstrucción y validación independientes (véanse el punto 65 y la definiciones del apéndice):

Resultados

71. En esta sección se deben presentar todos los datos de manera descriptiva en el texto, así como resumidos y tabulados con la pertinente evaluación estadística. Los datos de recuento radiactivo deben resumirse y expresarse de forma adecuada a la naturaleza del estudio, habitualmente en microgramos o miligramos equivalentes por masa de muestra, aunque pueden usarse otras unidades. Esta sección debe contener ilustraciones gráficas de los resultados, una reproducción de los datos cromatográficos y espectrométricos representativos, la identificación y cuantificación de los metabolitos y las rutas metabólicas propuestas, acompañadas de la estructura molecular de los metabolitos. Debe contener además, cuando proceda, la siguiente información:

1) Recuperación absoluta y relativa de la radiactividad en orina, heces, aire espirado y líquidos de lavado (de orina y heces) de la jaula.

— En los estudios dermatológicos, se incluirán también los datos de recuperación de la sustancia problema en la piel tratada y los lavados epidérmicos; y radiactividad residual en el dispositivo de cobertura de la piel y en la unidad metabólica, así como en los líquidos analizados del lavado epidérmico. Se ofrecen más observaciones en los puntos 74 a 77.

▼M4

— En los estudios de inhalación se incluirán también los datos de recuperación de la sustancia problema en los pulmones y tejidos nasales (8). Se ofrecen más observaciones en el punto 78.

2) Distribución en los tejidos, expresada en porcentaje de la dosis administrada y en concentración (microgramos equivalentes por gramo de tejido), y coeficiente de reparto tejidos-sangre o tejidos-plasma.

3) Se calculará el balance de masas en todos los estudios en que se valoren los tejidos corporales y las excretas.

4) Concentraciones plasmáticas y parámetros toxicocinéticos (biodisponibilidad, AUC, $C_{máx}$, $T_{máx}$, eliminación, semivida) medidos después de la administración por la vía o vías de exposición principales.

5) Velocidad y porcentaje de absorción de la sustancia problema después de su administración por la vía o vías de exposición principales.

6) Cantidades de la sustancia problema y de sus metabolitos (expresadas en porcentaje de la dosis administrada) que se recuperan en las excretas.

7) Referencias a los datos del apéndice que reflejan los resultados individuales de cada animal en todos los parámetros (dosis administrada, porcentaje de recuperación, concentraciones, parámetros toxicocinéticos, etc.).

8) representación gráfica de las rutas metabólicas propuestas y las estructuras moleculares de los metabolitos.

Discusión y conclusiones

72. En esta sección el autor o autores deben:

1) proponer una ruta metabólica hipotética basada en los resultados de metabolismo y eliminación de la sustancia problema;

2) comentar cualquier posible diferencia de eliminación y/o biotransformación de la sustancia problema en función de la especie y del sexo;

3) tabular y comentar la identificación y la cuantificación de los metabolitos, velocidades de eliminación, capacidad de bioacumulación y nivel residual en los tejidos del compuesto parental o de sus metabolitos y, en su caso, las posibles variaciones toxicocinéticas dependientes de la dosis;

4) incorporar a esta sección cualesquiera datos toxicocinéticos de interés que se hayan obtenido en el transcurso de los estudios de toxicidad;

5) presentar una conclusión concisa que esté respaldada por los resultados del estudio;

6) añadir las secciones que se juzguen necesarias o pertinentes.

73. Se pueden añadir secciones para adjuntar referencias bibliográficas, tablas, figuras, apéndices, etc.

▼M4

VÍAS DE EXPOSICIÓN ALTERNATIVAS

Cutánea

Tratamiento cutáneo

74. En esta sección se recoge información específicamente relacionada con la investigación toxicocinética de la sustancia problema por vía cutánea. La absorción cutánea se describe en el capítulo B.44 de este anexo [Absorción cutánea: método *in vivo* (9)]. Para otros parámetros como los relacionados con la distribución y el metabolismo puede aplicarse este método de ensayo B.36. En el tratamiento cutáneo se aplican una o más concentraciones de la sustancia problema. La sustancia problema (material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser la misma (o un análogo realista) que aquella a la que pudiera verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Las dosis deben seleccionarse de conformidad con los puntos 20-26 de este método de ensayo. En la selección de la dosis cutánea se tendrán en cuenta factores como la exposición humana previsible y las concentraciones a las que se haya observado toxicidad en otros estudios de toxicidad cutánea. La dosis cutánea se disolverá, si es preciso, en un vehículo adecuado y se aplicará en el volumen necesario para liberar la dosis prevista. Antes de proceder a la aplicación, se recorta el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Se puede recurrir al rasurado, pero, en este caso, debe efectuarse unas 24 horas antes del ensayo. En ambos casos hay que cuidar de no lesionar la piel, lo que podría alterar su permeabilidad. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia problema, una superficie equivalente aproximadamente al 10 % de la corporal. Cuando se trata de sustancias muy tóxicas, la superficie despejada puede ser inferior al 10 %, pero deberá cubrirse en todo lo posible con una capa delgada y uniforme del producto. En todos los grupos de tratamiento cutáneo se tratará una superficie de piel de la misma extensión. Las zonas tratadas se protegerán con un apósito bien sujeto. Los animales se enjaularán por separado.

75. Debe hacerse un estudio de lavado epidérmico para evaluar la fracción de la dosis de sustancia química aplicada que se puede eliminar de la piel lavando la zona tratada con agua y un jabón suave. Este estudio puede servir también para establecer el balance de masas cuando la sustancia problema se administra por vía cutánea. En el estudio de lavado epidérmico se aplica una dosis única de la sustancia problema a dos animales. La selección de la dosis se hará de conformidad con el punto 23 de este método de ensayo (véase también el tiempo de contacto epidérmico en el punto 76). Se determinan las cantidades de la sustancia problema que se recuperan en los líquidos de lavado, a fin de evaluar la eficacia con que dicho lavado elimina la sustancia de la piel.

76. Salvo que sea corrosiva, la sustancia problema se aplica y mantiene sobre la piel durante un tiempo mínimo de 6 horas. En el momento de retirar el apósito, la zona tratada se lava siguiendo el procedimiento descrito en el estudio de lavado epidérmico (véase el punto 75). Se analizará el contenido de sustancia residual en el apósito y en los líquidos de lavado. Al concluir la investigación, se sacrificará cada animal de manera compasiva, de conformidad con (2), y se le retirará la piel tratada. Se prepara debidamente un corte de piel tratada para analizarlo y valorar la sustancia (radiactividad) residual.

77. En la evaluación toxicocinética de los productos farmacéuticos puede ser necesario aplicar diversos procedimientos, de conformidad con el marco regulador apropiado.

▼M4

Inhalación

78. Se emplea una concentración única (o más, si es necesario) de la sustancia problema. Las concentraciones deben seleccionarse de conformidad con los puntos 20-26 de este método de ensayo. Los tratamientos de inhalación deben hacerse con un equipo inhalador de "cono nasal" o de "solo la cabeza" para evitar la absorción por otras vías (8). Si las condiciones de exposición son otras, habrá que justificar y documentar los cambios. Se definirá el tiempo de inhalación; es habitual una exposición de 4-6 horas.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Nº 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Capítulo B.45 del presente anexo. Absorción cutánea: método *in vitro*.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capítulo B.44 del presente anexo. Absorción cutánea: método *in vivo*.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Apéndice

DEFINICIONES

Absorción: conjunto de procesos por los que una sustancia pasa a los tejidos orgánicos. El término se refiere a la absorción del compuesto parental y de todos sus metabolitos. No debe confundirse con la "biodisponibilidad".

Absorción oral: porcentaje de la dosis de sustancia que es absorbido en el lugar de administración (es decir, el aparato digestivo). Este importante parámetro sirve para conocer la fracción de la sustancia química administrada que llega a la vena porta y, posteriormente, al hígado.

Acumulación: (bioacumulación)aumento del contenido de una sustancia en los tejidos a lo largo del tiempo (generalmente en el tejido adiposo y por administración continuada); si la velocidad a la que penetra una sustancia en el organismo es superior a la velocidad con que se elimina, la sustancia se acumula en el organismo y puede alcanzar concentraciones tóxicas.

ADME: siglas de "Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción".

AUC: (área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo): área bajo la curva que resulta de representar la concentración plasmática de una sustancia problema en función del tiempo. Representa la cantidad total de la sustancia problema que ha absorbido el organismo en un período establecido. En condiciones de linealidad, el AUC (desde el tiempo cero al infinito) es proporcional a la cantidad total de la sustancia problema que absorbe el organismo, independientemente de cuál sea la velocidad de absorción.

Autorradiografía: (autorradiografía de cuerpo entero): empleada para determinar cualitativa o cuantitativamente la localización de una sustancia química radiactiva en los tejidos, esta técnica se vale de las imágenes de rayos X o, más recientemente, de la fluoroscopia digital para visualizar moléculas (o fragmentos de moléculas) marcadas radiactivamente registrando la radiación emitida en la víscera o tejido que se desea estudiar. Comparada con la disección de órganos, la autorradiografía cuantitativa de cuerpo entero puede aportar ciertas ventajas para valorar la distribución de la sustancia problema, la recuperación total y la resolución del material radiactivo en los tejidos. Otra ventaja importante es que se puede aplicar a un modelo animal pigmentado para valorar la posible asociación de la sustancia problema con la melanina, capaz de unirse a ciertas moléculas. No obstante, y aunque puede facilitar una interesante visión global de los sitios de unión de alta capacidad y baja afinidad, esta técnica tendría limitaciones para reconocer regiones diana específicas, como los sitios de unión a receptores, para cuya detección se precisa una resolución relativamente alta y una elevada sensibilidad. Cuando se usa la autorradiografía deben realizarse, en un grupo aparte o en un estudio separado del ensayo de distribución en los tejidos, investigaciones para determinar el balance de masas del compuesto administrado, en las que todas las excretas (con la posible inclusión del aire espirado) y los restos del cuerpo de los animales sean homogeneizados y analizados con contador de centelleo líquido.

Autorradiografía microscópica de receptores: (o microautorradiografía): técnica que puede servir para comprobar la interacción de una sustancia xenobiótica con poblaciones celulares o sitios específicos de los tejidos, como en el caso de las investigaciones de la unión a los receptores o de los mecanismos de acción específicos, donde se precisan una resolución y una sensibilidad elevadas que no se consiguen con otras técnicas como la autorradiografía de cuerpo entero.

Balance de masas: expresa la cantidad de sustancia que entra y sale del sistema.

Balance de materia: véase "balance de masas".

▼M4

Bioacumulación: véase "Acumulación".

Biodisponibilidad: fracción de la dosis administrada que pasa a la circulación sistémica o está disponible en los tejidos para ejercer su actividad fisiológica. Frecuentemente, la biodisponibilidad de una sustancia se refiere al compuesto parental, pero también puede referirse a su metabolito. Tiene en cuenta solamente una forma química. *Nota bene:* no confundir biodisponibilidad con absorción. Así, la diferencia entre la absorción oral (contenido de la sustancia en la mucosa intestinal y en la circulación portal) y la biodisponibilidad (contenido en la sangre circulante y en los tejidos) puede deberse, entre otros factores, a: 1) la degradación química efectuada por digestión en la mucosa intestinal, 2) la circulación enterohepática que devuelve parte de la sustancia a la luz intestinal, o 3) el metabolismo hepático de primer paso (10). La biodisponibilidad del componente tóxico (compuesto parental o metabolito) es un parámetro esencial en la evaluación del riesgo humano (extrapolación entre dosis altas y bajas, o entre distintas vías), ya que permite obtener un valor interno partiendo de los valores de NOAEL o BMD (dosis administrada), que son externos. Para evaluar los efectos hepáticos que siguen a una administración oral, basta con conocer la absorción oral. En cambio, cuando se estudian los efectos en lugares distintos de la vía de entrada, la biodisponibilidad es en general un parámetro más fiable que la absorción para evaluar el riesgo.

Biopersistencia: véase "persistencia".

Biotransformación: conversión química (generalmente enzimática) de la sustancia de interés en un producto diferente, que tiene lugar en el organismo. Es sinónimo de "metabolismo".

$\mathbf{C_{máx}}$: concentración máxima (pico) en sangre (plasma o suero), o bien excreción máxima (pico) en orina y heces, que se produce después de la administración.

Coeficiente de reparto: también llamado coeficiente de distribución, es una medida de la solubilidad diferencial de una sustancia en dos solventes.

Compartimento: parte (o unidad) estructural o bioquímica de un organismo, tejido o célula que puede diferenciarse del resto.

Concentración máxima (pico) en sangre (plasma o suero): máxima concentración (o pico) que se alcanza en la sangre (plasma o suero) después de administrar una sustancia (véase también "$C_{máx}$").

Concentraciones sanguíneas (plasmáticas) en estado estacionario: estado de no equilibrio de un sistema abierto, en el que todas las fuerzas que actúan sobre él están exactamente contrarrestadas por fuerzas opuestas de manera tal que todos sus componentes se hallan en concentración estacionaria pese a que fluye materia a través del sistema.

Correlación o "read across": método por el cual se toman los datos conocidos de una variable en respuesta a una o varias sustancias para predecir el comportamiento de esa variable en respuesta a la sustancia problema.

Distribución: dispersión de una sustancia problema y de sus metabolitos por todo el organismo.

Distribución en los tejidos: movimiento reversible de una sustancia problema por los distintos tejidos orgánicos. La distribución en los tejidos se puede estudiar mediante disección de órganos, homogeneización, combustión y recuento de centelleo líquido, o mediante autorradiografía cualitativa y cuantitativa del cuerpo entero. El primer método resulta válido para obtener la concentración y el porcentaje de recuperación en los tejidos y en el resto del cuerpo de un mismo animal, pero puede no alcanzar resolución adecuada en todos los tejidos y puede arrojar una recuperación total inferior a de lo deseable (< 90 %). Consúltense más arriba las definiciones del segundo método.

Enzimas/isoenzimas: proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas. Las isoenzimas son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas semejantes, pero que presentan secuencias de aminoácidos diferentes.

▼M4

Excreción biliar: excreción que tiene lugar a través de los conductos biliares.

Excreción: conjunto de procesos por los que una sustancia administrada y/o sus metabolitos son eliminados del organismo.

Exógeno: generado o introducido desde fuera del organismo o sistema orgánico.

Extrapolación: método por el que se infiere uno o más valores desconocidos a partir de otros conocidos u observados.

Inducción enzimática: síntesis enzimática que se produce como respuesta a un estímulo ambiental o una molécula inductora.

Linealidad/cinética lineal: un proceso tiene una cinética lineal cuando todos los intercambios entre compartimentos se producen a una velocidad proporcional a la concentración o cantidad presente; es una cinética de primer orden. En consecuencia, los volúmenes de eliminación y distribución son constantes, al igual que la semivida. Las concentraciones alcanzadas son proporcionales al nivel de dosis (exposición) y la acumulación es más facil de predecir. La existencia o no de linealidad se puede determinar comparando los parámetros oportunos, como el AUC, después de administrar dosis diferentes o después de exposiciones únicas y repetidas. La falta de dependencia de la dosis puede indicar saturación de las enzimas que intervienen en el metabolismo del compuesto; un aumento del AUC después de la exposición continuada en comparación con la exposición única puede indicar inhibición del metabolismo; y una disminución del AUC puede indicar, a su vez, inducción del metabolismo [véase también (11)].

Mecanismo (modo) de toxicidad/mecanismo (modo) de acción: por mecanismo de acción se entienden las interacciones bioquímicas específicas por las que una sustancia química produce su efecto. Por modo de acción se entienden las principales rutas o vías más generales por las que una sustancia llega a producir su efecto (o toxicidad).

Metabolismo: es sinónimo de "biotransformación".

Metabolitos: productos del metabolismo o de los procesos metabólicos.

Modelización de sistemas (toxicocinética basado en la fisiología, basada en la farmacocinética, farmacocinética basada en la fisiología, basada en la biología, etc.): modelo abstracto que aplica el lenguaje matemático para describir el comportamiento de un sistema.

Parámetros enzimáticos: K_m (constante de Michaelis) y $V_{máx}$ (velocidad máxima).

Persistencia (biopersistencia): presencia prolongada de una sustancia en un sistema biológico debido a que resiste la degradación/eliminación.

Saturación: estado en virtud del cual uno o varios procesos cinéticos (absorción, metabolismo o eliminación) se encuentran en su límite máximo, es decir, saturados.

Semivida ($t_{1/2}$): tiempo necesario para que la concentración de una sustancia se reduzca a la mitad en un compartimento dado. Normalmente se refiere a la concentración plasmática o a la cantidad de sustancia en todo el organismo.

Sensibilidad: capacidad de un método o instrumento para reflejar pequeñas diferencias en el grado de respuesta de una variable de interés.

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

Tejido diana: tejido en el que se manifiesta el efecto adverso principal de un agente tóxico.

$T_{máx}$: tiempo que se tarda en alcanzar la $C_{máx}$.

▼M4

Toxicocinética (farmacocinética): estudio de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias a lo largo del tiempo.

Validación de los modelos: proceso por el cual se evalúa la adecuación de un modelo para describir de manera coherente los datos toxicocinéticos disponibles. Los modelos se pueden evaluar mediante comparación visual y estadística de las predicciones del modelo con los valores experimentales obtenidos para una variable independiente común (por ejemplo, el tiempo). Se ha de justificar la magnitud de la evaluación en relación con el uso que se pretende dar al modelo.

Velocidad (o tasa) de aclaramiento: es una medida cuantitativa de la cantidad de una sustancia problema que se elimina de la sangre, el plasma o un determinado tejido por unidad de tiempo.

Vía de administración (oral, i.v., cutánea, inhalatoria, etc.): medio por el cual se administran las sustancias químicas al organismo (por ejemplo, por vía oral con los alimentos o mediante sonda gástrica, por inyección intravenosa, por vía cutánea a través de la piel, por inhalación con el aire aspirado, etc.).

Vías de destoxificación: conjunto de procesos que llevan a la eliminación de las sustancias tóxicas del organismo, ya sea por degradación metabólica o por excreción.

▼B

B.37. **NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado *in vitro* para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios *in vitro* no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Sustancias organofosforadas: ésteres organofosforados sin carga, tioésteres o anhídridos de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos u organofosforamídicos, o de ácidos fosforotioicos, fosfono-tioicos o fosforotioamídicos afines, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase se sustancias.

Neurotoxicidad retardada: síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, axonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia con un lote de control positivo como medio para demostrar que, en las condiciones de ensayo del laboratorio, no cambia significativamente la respuesta de las especies utilizadas.

Como ejemplo de neurotóxico de amplia utilización está el folfato de tri-o-tolilo [nº CAS 78-30-8, nº EINECS 201-103-5, denominación CAS: tris(2-metilfenil) éster del ácido fosfórico], conocido también como tri-o-cresilfosfato.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se da una sola dosis oral de la sustancia estudiada a gallinas domésticas, protegidas de los efectos colinérgicos agudos, cuando convenga. Se observa durante 21 días la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la administración. A los 21 días de la exposición, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

▼B

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Preparación**

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará normalmente por vía oral, utilizando sondas gástricas, cápsulas de gelatina o un método similar. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.5.2. **Condiciones del ensayo**

1.5.2.1. *Animales de experimentación*

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta *(Gallus gallus domesticus),* de una edad comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.5.2.2. *Número y sexo*

Además del lote de tratamiento, se utilizarán tanto un lote de control del vehículo como un lote de control positivo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (3 en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras 6 puedan sobrevivir durante el período de 21 días de observación de las patologías.

El lote de control positivo puede estudiarse a la vez o bien ser un lote de control estudiado recientemente. Debe incluir al menos 6 gallinas, tratadas con un neurotóxico conocido de efecto retardado, de las que 3 se destinarán a las pruebas bioquímicas y otras 3 a la observación de la patología. Se recomienda la actualización periódica de los datos de los antecedentes. Deben obtenerse nuevos datos de lotes de control positivo cuando el laboratorio que realice las pruebas haya cambiado algún elemento fundamental de estas (por ejemplo, raza, alimentación, condiciones de alojamiento).

▼B

1.5.2.3. *Dosis*

Debe realizarse un estudio preliminar con un número adecuado de gallinas y lotes de distintas dosis, a fin de determinar la dosis que debe utilizarse en el estudio principal. En el estudio preliminar es necesario que se produzca letalidad, a fin de definir una dosis adecuada para el estudio principal. No obstante, para evitar la muerte debida a los efectos colinérgicos agudos, puede utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas. Pueden utilizarse diversos métodos de ensayo para evaluar la dosis máxima no letal de las sustancias estudiadas (véase el método B.1 *bis*). También puede ayudar a seleccionar la dosis la consideración de datos de antecedentes de las gallinas u otra información toxicológica.

La dosis de la sustancia en el estudio principal debe ser lo más elevada posible, teniendo en cuenta los resultados del estudio preliminar de selección de la dosis y el límite superior a 2 000 mg/kg de peso corporal. La mortalidad que pueda darse no debe interferir con la supervivencia de animales suficientes para las pruebas bioquímicas (6) e histológicas (6) hasta el día 21. Debe utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas, para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos.

1.5.2.4. *Ensayo límite*

Si un ensayo con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5.2.5. *Período de observación*

El período de observación debe ser de 21 días.

1.5.3. **Procedimiento**

Tras administrar un protector para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos, se administra una sola dosis de la sustancia estudiada.

1.5.3.1. Observación general

La observación debe iniciarse inmediatamente tras la administración. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente varías veces durante los 2 primeros días y posteriormente al menos una vez al día durante un período de 21 días o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración de las anomalías de comportamiento. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas seleccionadas para la observación de las patologías y someterse a un período de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

▼B

1.5.3.2. Peso corporal

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.

1.5.3.3. Bioquímica

En el plazo de unos días después de la administración, deben sacrificarse 6 gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo, y tres del lote de control positivo (cuando este lote se utilice en paralelo). El cerebro y la médula lumbar se prepararán y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificarán 3 aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras tres a las 48 horas, mientras que las tres gallinas de los controles positivos se sacrificarán a las 24 horas. Si la observación de signos clínicos de intoxicación (esta puede evaluarse frecuentemente observando el momento de aparición de signos colinérgicos) indica que el agente tóxico se elimina muy despacio, podrá ser preferible tomar dos veces tejidos de 3 aves entre las 24 y las 72 horas a partir de la administración.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse *in vivo* una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

1.5.3.4. Autopsia macroscópica

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.5.3.5. Examen histopatológico

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán *in situ,* utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones mediadorsal y lumbo-sacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón.

2. **RESULTADOS**

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros sí puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

▼B

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

— variedad utilizada,

— número y edad de los animales,

— origen, condiciones de alojamiento, etc.,

— peso de cada animal al inicio de la prueba.

Condiciones del ensayo:

— datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga,

— justificación de la elección del vehículo,

— datos sobre la administración de la sustancia estudiada,

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua,

— justificación de la selección de la dosis,

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado

— identidad y datos de la administración de cualquier protector.

Resultados:

— datos sobre el peso corporal,

— datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad,

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no),

— descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas,

— observaciones de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de tos resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

El presente método es análogo a la TG 418 de la OCDE

▼B

B.38. **NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS. ESTUDIO POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE 28 DÍAS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado *in vitro* para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios *in vitro* no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Este ensayo de 28 días de neurotoxicidad retardada proporciona información sobre los riesgos sanitarios que puede provocar una exposición repetida a lo largo de un período limitado de tiempo. Da información sobre la respuesta a las dosis y proporciona una estimación del nivel sin efectos adversos observados que puede ser útil para establecer criterios de seguridad de la exposición.

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Sustancias organofosforadas: ésteres organofosforados sin carga, tioésteres o anhídridos de ácidos organofosfóricos, organofosfóricos u organofosforamídicos, o de ácidos fosforotioicos, fosfono-tioicos o fosforotioamídicos afines, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase de sustancias.

Neurotoxicidad retardada: síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, axonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se dan dosis orales diarias de la sustancia estudiada a gallinas domésticas durante 28 días. Se observa al menos diariamente la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis, hasta que pasen 14 días desde la última administración. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la última administración. A las dos semanas de la última dosis, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará todos y cada uno de los días por vía oral, de preferencia utilizando sondas gástrica o cápsulas de gelatina. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Animales de experimentación*

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta *(Gallus gallus domesticus),* de una edad comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.4.2.2. *Número y sexo*

Se utilizarán generalmente al menos tres lotes de tratamiento y un lote de control del vehículo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (3 en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras 6 puedan sobrevivir durante el período de 14 días tras la exposición destinado a la observación.

1.4.2.3. *Dosis*

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los resultados de un ensayo de neurotoxicidad aguda retardada y cualesquiera otros datos existentes sobre toxicidad o cinética del compuesto estudiado. La dosis superior debe elegirse con el fin de inducir efectos tóxicos, de preferencia neurotoxicidad retardada, pero sin producir la muerte ni sufrimiento patente. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior.

▼B

1.4.2.4. *Ensayo límite*

Si un ensayo con una dosis de al menos 1 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana prevista indique la necesidad de utilizar una dosis superior

1.4.2.5. *Período de observación*

Todos los animales se observarán al menos una vez al día durante el período de exposición y durante 14 días después, salvo en los casos de autopsia prevista.

1.4.3. **Procedimiento**

Los animales reciben la sustancia estudiada todos y cada uno de los días durante un período de 28 días.

1.4.3.1. *Observación general*

La observación debe iniciarse inmediatamente tras el inicio del tratamiento. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día durante cada uno de los 28 días del tratamiento y durante 14 días tras la última administración o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración. Las observaciones incluirán las anomalías del comportamiento, sin limitarse a ellas. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas y someterse a un período de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

1.4.3.2. *Peso corporal*

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la primera administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.

1.4.3.3. *Bioquímica*

En el plazo de unos días después de la última administración, deben sacrificarse 6 gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo. El cerebro y la médula lumbar se prepararán y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificarán 3 aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras 3 a las 48 horas de la última administración. Si de datos procedentes del estudio de toxicidad aguda o de otros estudios (por ejemplo, de toxicocinética), se deduce que es preferible utilizar otros tiempos de sacrificio tras la última administración, entonces deberán aplicarse estos tiempos aportando la justificación pertinente.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse *in vivo* una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

▼B

1.4.3.4. *Autopsia macroscópica*

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.4.3.5. *Examen histopatológico*

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán *in situ,* utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones media-dorsal y lumbosacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón. En principio, debe hacerse el examen microscópico de los tejidos conservados de todos los animales de los lotes de control y de dosis alta. Cuando haya pruebas de efectos en el lote de dosis alta, deberá hacerse también el examen microscópico de las gallinas de los lotes de dosis intermedia y baja.

2. **RESULTADOS**

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros sí puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

Animales de ensayo:

— variedad utilizada,

— número y edad de los animales,

— origen, condiciones de alojamiento, etc.,

— peso de cada animal al inicio de la prueba.

▼B

Condiciones del ensayo:

— datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga,

— justificación de la elección del vehículo,

— datos sobre la administración de la sustancia estudiada,

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua,

— justificación de la selección de la dosis,

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado,

— justificación de la elección de los tiempos para las determinaciones bioquímicas, en caso de que no sean 24 y 48 horas.

Resultados:

— datos sobre el peso corporal,

— datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad,

— nivel sin efectos adversos observados,

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no),

— descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas,

— observaciones de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. **REFERENCIAS**

El presente método es análogo a la TG 419 de la OCDE.

▼B

B.39. ENSAYO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS) EN HEPATOCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 486 sobre el ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* (1997).

1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* tiene por objeto determinar sustancias de ensayo que inducen la reparación del ADN en los hepatocitos de animales tratados (1) (2) (3) (4).

El presente ensayo *in vivo* constituye un método de investigación de los efectos genotóxicos de los productos químicos en el hígado y sirve para detectar lesiones en el ADN y su posterior reparación en las células hepáticas. El hígado suele ser el lugar donde más se metabolizan los compuestos absorbidos y por ello constituye el órgano más apropiado para la detección de lesiones del ADN *in vivo*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo no llega al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

La síntesis de ADN no programada (UDS) se determina midiendo la incorporación de nucleósidos marcados en células que no se encuentran en la fase S de síntesis programada de ADN. La técnica más empleada consiste en determinar la captación de timidina tritiada (^{3}H-TdR) por autorradiografía. Para los ensayos de UDS *in vivo* es preferible utilizar hígados de rata. También pueden emplearse otros tejidos, si bien no se tratan en las presentes directrices.

La detección de una respuesta de UDS depende del número de bases del ADN eliminadas y repuestas en el sitio de la lesión. De ahí que el ensayo de UDS sea particularmente útil para detectar la reparación de secuencias largas (20 a 30 bases; secuencias largas de reparación) inducida por una sustancia. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo para detectar la reparación de secuencias cortas (1 a 3 bases; secuencias cortas de reparación) es mucho menor. Por otra parte, las alteraciones mutagénicas pueden deberse a una falta de reparación o a una reparación o replicación erróneas de las lesiones del ADN. La magnitud de la respuesta de UDS no es indicativa de la fidelidad del proceso de reparación. Además de ello, es posible que un mutágeno reaccione con el ADN, pero que la lesión de este no se repare por un mecanismo de reparación de escisión. La falta de información específica sobre la actividad mutagénica que caracteriza al ensayo UDS se ve compensada por su sensibilidad potencial, ya que detecta los efectos en todo el genoma.

Véase asimismo la Introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

Células en reparación: células con un número neto de granulaciones nucleares (NGN) superior a un número preestablecido que el laboratorio donde se realiza el ensayo ha de fundamentar.

Número neto de granulaciones nucleares (NGN): medida cuantitativa de la síntesis de ADN no programada en las células por autorradiografía: se calcula restando el número medio de granulaciones citoplasmáti-cas (GC) en las zonas citoplasmáticas equivalentes al núcleo del número de granulaciones nucleares (GN): NGN = GN - GC. Primero se calcula el NGN de cada célula y después el correspondiente a todo un cultivo o a cultivos paralelos, etc.

▼B

Síntesis de ADN no programada (UDS): síntesis de reparación de ADN tras la escisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* detecta la síntesis de reparación del ADN tras la escisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos. El ensayo suele fundarse en la incorporación de ^{3}H-TdR al ADN de hepatocitos de los cuales una escasa proporción se encuentra en la fase S del ciclo celular. La incorporación de ^{3}H-TdR suele determinarse por autorradiografía, ya que esta técnica no es tan sensible a las interferencias debidas a las células en fase S como lo es, por ejemplo, el recuento por centelleo de líquidos.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Selección de la especie animal*

Si bien suelen emplearse ratas, pueden utilizarse otras especies de mamíferos apropiadas. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. *Alojamiento y alimentación de los animales*

Se aplicarán las condiciones generales recogidas en la Introducción general de la parte B. La humedad debe ser del 50 al 60 %.

1.4.1.3. *Preparación de los animales*

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos 5 días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

1.4.1.4. *Preparación de la sustancia de ensayo*

Las sustancias de ensayo sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados y, si es preciso, diluirse antes de su administración a los animales. Las sustancias de ensayo líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. Han de emplearse soluciones de la sustancia de ensayo recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible conservarlas.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no deberá producir efectos tóxicos a las dosis empleadas. Es preciso cerciorarse de que el disolvente o vehículo no produce reacciones químicas con la sustancia de ensayo. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

▼B

1.4.2.2. *Controles*

Deberán realizarse controles positivos y negativos (disolvente o vehículo) en paralelo en cada parte independiente del experimento. Salvo por lo que respecta a la exposición a la sustancia de ensayo, los animales de los lotes de control deben tratarse exactamente igual que los de los lotes tratados.

En los controles positivos se emplearán sustancias de las que se sepa que inducen la síntesis de ADN no programada cuando se administran en dosis con las que se prevé un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Los controles positivos que requieran activación metabólica se realizarán con dosis que provoquen una respuesta moderada (4). Las dosis del control positivo pueden ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

Período de muestreo	Sustancia	Nº CAS	Nº EINECS
Corto (2 a 4 horas)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Largo (12 a 16 horas)	N-2-fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. La sustancia del control positivo puede administrarse por una vía distinta de la de la sustancia de ensayo.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

El número de animales deberá decidirse tomando en consideración la variación biológica natural de la respuesta al ensayo. Cada lote estará constituido al menos por 3 animales analizables. Si se dispone de una base de datos de controles históricos importante, bastarán 1 o 2 animales para los lotes de los controles negativos y positivos realizados en paralelo.

Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo, preferiblemente en machos. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. **Pauta de tratamiento**

Las sustancias de ensayo suelen administrarse en una sola vez.

1.5.3. **Dosis**

En principio, se administran al menos dos dosis distintas. Se entiende por «dosis máxima» la que produce tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo, resultaría probablemente letal. Por lo general, la dosis inferior es del 50 % al 25 % de la dosis máxima.

▼B

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitó-genos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal.

La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad hepática (por ejemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo suele administrarse por sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada. Pueden emplearse otras vías de administración, siempre que se justifiquen. La vía intraperitoneal no está indicada, ya que podría exponer el hígado a la sustancia de ensayo directamente en lugar de a través del sistema circulatorio. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o inyección depende del tamaño del animal de ensayo, pero no excederá de 2 ml/100 g de peso corporal. Deberá justificarse la administración de volúmenes superiores a este. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

1.5.6. **Preparación de los hepatocitos**

Se extraen hepatocitos de los animales tratados, por lo general de 12 a 16 horas después de la administración de la sustancia de ensayo. Suele ser necesaria otra toma previa (generalmente de 2 a 4 horas después del tratamiento), salvo que a las 12-16 horas haya una respuesta positiva clara. No obstante, pueden aplicarse otros períodos de muestreo, si así lo justifican los datos toxicocinéticos.

Los cultivos de hepatocitos de mamífero a corto plazo se realizan perfundiendo el hígado *in situ* con colage-nasa y dejando que los hepatocitos recién disociados se adhieran a una superficie adecuada. La viabilidad de los hepatocitos de los animales del control negativo ha de ser del 50 % como mínimo (5).

1.5.7. **Determinación de la síntesis de ADN no programada**

Los hepatocitos de mamífero recién aislados se incuban en un medio con ^{3}H-TdR durante un tiempo adecuado, por ejemplo, de 3 a 8 horas. Al término de la incubación, se retiran las células del medio y pueden entonces incubarse en otro medio con un exceso de timidina sin tratar con el fin de reducir la radiactividad no incorporada *(cold chase)*. A continuación, se aclaran las células, se fijan y se tiñen. Esta segunda incubación puede no ser necesaria si la primera ha sido más larga. Se bañan los portaobjetos en una emulsión autorradiográfica, se exponen en la oscuridad (por ejemplo, refrigerados, de 7 a 17 días), se revelan y tiñen y se cuentan los granos de plata expuestos. Se preparan dos o tres portaobjetos por animal.

▼B

1.5.8. **Análisis**

Las preparaciones han de contener un número suficiente de células de morfología normal para que la evaluación de la síntesis de ADN no programada sea significativa.

Se observan las preparaciones al microscopio en busca de signos de citotoxicidad manifiesta (por ejemplo, picnosis, índice reducido de marcado radiactivo, etc.).

Se codifican los portaobjetos antes del recuento de granulaciones. Por lo general, se cuentan 100 células por animal, en dos portaobjetos como mínimo. El recuento de menos de 100 células por animal deberá estar debidamente justificado. Si bien los núcleos en fase S no se consideran en el recuento de granulaciones, puede registrarse la proporción de células en fase S.

Se determinará con métodos apropiados la cantidad de ^{3}H-TdR incorporada en los núcleos y el citoplasma de las células con morfología normal, revelada por el depósito de granos de plata.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se proporcionarán los datos de cada portaobjetos y de cada animal. Se resumirán todos los datos en forma de tabla. Se calculará el número neto de granulaciones nucleares (NGN) por célula, por animal y por dosis y tiempo restando el número de GC del de GN. Si se cuentan las células en reparación, se motivará el criterio aplicado para definir las «células en reparación», que deberá fundarse en datos relativos a controles históricos negativos o realizados en paralelo al ensayo. Los resultados numéricos pueden evaluarse por medio de métodos estadísticos, que deberán seleccionarse y justificarse antes de llevar a cabo el estudio.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Entre los criterios para determinar si una respuesta es positiva o negativa se encuentran los siguientes:

respuesta positiva:
- i) el NGN es superior a un valor preestablecido fundado en datos de controles históricos obtenidos en el laboratorio, o
- ii) el NGN supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo;

respuesta negativa:
- i) el NGN no supera el umbral correspondiente a controles históricos, o
- ii) el NGN no supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo.

▼B

Debe considerarse la importancia biológica de los resultados. Se tomarán en consideración, por ejemplo, la variabilidad entre animales, la relación dosis-respuesta y la citotoxicidad. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia de ensayo. Con independencia del número de veces que se repita el experimento, los resultados pueden seguir siendo ambiguos o dudosos.

Un resultado positivo en el ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca lesiones del ADN en los hepatocitos de mamífero *in vivo* que pueden repararse por síntesis de ADN no programada *in vitro*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca lesiones del ADN detectables mediante este ensayo.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo pase al torrente circulatorio o llegue específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,

— peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

— controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),

— datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,

— fundamento de la selección de la dosis,

— preparación de la sustancia de ensayo,

— administración de la sustancia de ensayo,

— fundamento de la elección de la vía de administración,

— métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,

▼B

— conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,

— calidad de los alimentos y el agua,

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— métodos de preparación y cultivo de los hepatocitos,

— técnica autorradiográfica utilizada,

— criterios de evaluación,

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

— media de granulaciones nucleares, granulaciones citoplasmáticas y granulaciones nucleares netas por portaobjetos, animal y lote,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— evaluación estadística, si se ha realizado,

— signos de toxicidad,

— datos de los controles negativos (disolvente o vehículo) y positivos realizados en paralelo,

— datos de controles históricos negativos (disolvente o vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— número de «células en reparación», si se ha determinado,

— número de células en fase S, si se ha determinado,

— viabilidad de las células.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Ashby, J., Lefevre, F. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Miuation Res.,* 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermúdez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation* Res., *189,* pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Suppkmentary Mutage-nicity* Tests; U*KEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Repon. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo, Mutations Res,* 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Bet-ween the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation* Res., *291,* pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, pp. 553-562.

▼B

B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO:* ENSAYO DE RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÁNEA (RET)

1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 430 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

La corrosión cutánea se refiere a la producción de daños tisulares irreversibles en la piel tras la aplicación de una sustancia [según la definición del Sistema Armonizado Mundial *(Globally Harmonized System,* GHS) de clasificación y etiquetado de productos químicos] (1). El presente método contempla un procedimiento para evaluar la corrosividad sin recurrir a animales vivos.

Tradicionalmente, la evaluación de la corrosividad cutánea se hacía con animales de laboratorio (2). La preocupación por el dolor y el sufrimiento de los animales utilizados en esa evaluación se ha tenido en cuenta en la revisión del método de ensayo B.4, para permitir la determinación de la corrosión cutánea mediante métodos alternativos, *in vitro,* que eviten el dolor y el sufrimiento.

Un primer paso hacia la definición de métodos alternativos que se pudieran utilizar en los ensayos de corrosividad cutánea con fines normativos fue la realización de estudios de prevalidación (3). Posteriormente se llevó a cabo un estudio oficial de validación de métodos *in vitro* para evaluar la corrosión cutánea (4) (5) (6) (7) (8). Como consecuencia de estos estudios y de otros datos publicados, se llegó a la recomendación de que los siguientes métodos podían utilizarse para predecir el efecto corrosivo *in vivo* de la piel (9) (10) (11): el ensayo con un modelo de piel humana (véase el método de ensayo 40 *bis)* y el ensayo de resistencia eléctrica transcutánea (el presente método).

Mediante un estudio de validación y otros estudios publicados se ha sabido que el ensayo de resistencia eléctrica transcutánea (RET) (12) (13) puede discriminar de forma fiable entre agentes corrosivos y no corrosivos conocidos de la piel (5) (9).

El ensayo descrito en el presente método permite la identificación de sustancias químicas y mezclas corrosivas. Asimismo permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas con el apoyo de pruebas sopesadas derivadas de otro tipo de información disponible (por ejemplo, pH, relaciones estructura-actividad, datos con hombres o animales) (1) (2) (11) (14). No da información sobre la irritación cutánea ni permite la subcategorización de sustancias corrosivas que se contempla en el Sistema Armonizado Mundial de clasificación (1).

Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una única exposición de la piel, se recomienda seguir la estrategia de ensayos secuenciales que figura adjunta al método de ensayo B.4 (2) y que proporciona el Sistema Armonizado Mundial (1). Esta estrategia de ensayos incluye la realización de pruebas *in vitro* de corrosión cutánea (como las descritas en el presente método) y de irritación cutánea antes de considerar las pruebas con animales vivos.

▼B

1.2. DEFINICIÓN

Se entenderá por: **corrosión cutánea *in vivo*** la producción de lesiones cutáneas irreversibles consistentes en necrosis visible en todo el espesor de la epidermis y hasta en la dermis, debida a la aplicación de una sustancia durante hasta 4 horas; las reacciones de corrosión se tipifican como úlceras, hemorragia, costras hemorrágicas y, hacia el final del período de observación de 14 días, como decoloración de la piel, zonas de alopecia completa y cicatrices; debe recurrirse a la histopatología para evaluar las lesiones dudosas;

resistencia eléctrica transcutánea (RET) la medida de la impedancia eléctrica de la piel, como valor de resistencia en kiloohmios; se trata de un método simple y sólido para evaluar la función de barrera, consistente en registrar el paso de iones a través de la piel mediante el uso de un puente de Wheatstone.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Cuadro 1

Sustancias de referencia

Denominación	Nº EINECS	Nº CAS	
1,2-diaminopropano	201-155-9	78-90-0	Fuertemente corrosivo
Ácido acrílico	201-177-9	79-10-7	Fuertemente corrosivo
2-terc-butilfenol	201-807-2	88-18-6	Corrosivos
Hidróxido de potasio (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosivos
Ácido sulfúrico (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosivos
Ácido octanoico (ácido caprílico)	204-677-5	124-07-02	Corrosivos
4-amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	No corrosivo
Eugenol	202-589-1	97-53-0	No corrosivo
Bromuro de fenetilo	203-130-8	103-63-9	No corrosivo
Tetracloroetileno	204-825-9	27-18-4	No corrosivo
Ácido isoesteárico	250-178-0	30399-84-9	No corrosivo
4-(metiltio)-benzaldehído	222-365-7	3446-89-7	No corrosivo

La mayoría de estas sustancias proceden de la lista de sustancias seleccionadas para el estudio internacional de validación del ECVAM (4). Su elección se basa en los criterios siguientes:

i) igual número de sustancias corrosivas y no corrosivas,

▼B

ii) sustancias disponibles en el comercio y representativas de la mayoría de las clases químicas pertinentes,

iii) inclusión de sustancias fuertemente corrosivas y de sustancias menos corrosivas para permitir la discriminación según la potencia corrosiva,

iv) elección de sustancias que puedan manipularse en un laboratorio sin plantear peligros graves aparte de la corrosividad.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La sustancia problema se aplica durante un máximo de 24 horas en la superficie epidérmica de discos de piel en un sistema de ensayo bicompartimental, donde los discos hacen de separación entre los compartimentos. Los discos de piel se toman de ratas, sacrificadas de forma compasiva a los 28 o 30 días de edad. Las sustancias corrosivas se caracterizan por su capacidad de producir una pérdida de la integridad de la capa córnea normal y de la función de barrera. Esta pérdida se mide como reducción de la RET por debajo de un umbral (12). En relación con la RET de ratas, se ha elegido un valor límite de 5 kΩ basándose en muchos datos sobre una amplia gama de sustancias, ya que la gran mayoría de valores estaba claramente muy por encima (a menudo > 10 kΩ), o muy por debajo (a menudo < 3 kΩ) de este valor (12). Generalmente, el valor de la RET reducida por los materiales que no son corrosivos para los animales, tanto si son irritantes como si no, queda por encima de este límite. Por otra parte, el uso de otros preparados de piel o de otros equipos puede alterar el valor límite, lo que hace necesaria otra validación.

Se incorpora al procedimiento una fase de fijación de colorante para confirmar los resultados positivos con la RET, incluidos los casos de valores próximos a 5 kΩ. La fijación de colorante determina si el aumento de la permeabilidad iónica se debe a la destrucción física de la capa córnea. Se ha visto que el método de RET con piel de rata sirve para predecir el valor de la corrosividad *in vivo* del conejo, evaluada según el método de ensayo B.4 (2). Debe señalarse que el ensayo *in vivo* con conejos da unos valores muy moderados de corrosividad cutánea y de irritación cutánea si se compara con el ensayo del parche de piel humana (15).

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Animales**

La rata es la especie elegida porque ya se ha demostrado previamente la sensibilidad de su piel a las sustancias de esta prueba (10). La edad (en el momento de tomar la piel) y la cepa de la rata son especialmente importantes para conseguir que los folículos pilosos estén en fase latente antes de que se inicie el crecimiento del pelo de los adultos.

▼B

Se quita cuidadosamente con maquinilla pequeña el pelo dorsal y lateral de ratas jóvenes, de unos 22 días de edad, machos o hembras, de una cepa derivada de la Wistar o de otra comparable. A continuación se lavan los animales frotándolos cuidadosamente al mismo tiempo que se cubre la zona pelada con una solución antibiótica (que contenga, por ejemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol y anfotericina en concentraciones que sean eficaces para inhibir el crecimiento bacteriano). Los animales se vuelven a lavar con antibióticos al tercer o cuarto día después del primer lavado y se utilizan en el plazo de 3 días desde el segundo lavado, cuando la capa córnea se ha recuperado de la eliminación del pelo.

1.5.2. **Preparación de los discos de piel**

Los animales se sacrifican compasivamente cuando tienen de 28 a 30 días (esta edad es de importancia fundamental). A continuación se retira la piel dorsolateral de cada animal y se le quita el exceso de grasa subcutánea, separando esta cuidadosamente de la piel. Se toman discos de piel de un diámetro aproximado de 20 mm. Puede guardarse la piel antes de utilizar los discos si se demuestra que los datos obtenidos con controles positivos y negativos son equivalentes a los obtenidos con piel fresca.

Cada disco de piel se coloca sobre uno de los extremos de un tubo de PTFE (politetrafluoretileno), comprobando que la superficie epidérmica esté en contacto con el mismo. Se coloca a presión un anillo de goma en el extremo del tubo para mantener la piel en su sitio y se recorta el tejido sobrante. En la figura 2 se dan las dimensiones del anillo y del tubo. Después se sella con cuidado el anillo de goma al extremo del tubo de PTFE con vaselina. El tubo se sujeta mediante una pinza de muelle dentro de una cámara receptora que contiene una solución de $MgSO_4$ (154 mM) (figura 1). El disco de piel debe quedar totalmente sumergido en la solución de $MgSO_4$. De la piel de una sola rata pueden obtenerse hasta 10 o 15 discos de piel.

Antes de iniciar el ensayo, se mide la resistencia eléctrica de dos discos de piel, para controlar la calidad de la piel de cada animal. El valor de la resistencia de ambos discos debe ser superior a 10 kΩ para que los discos restantes puedan utilizarse en el ensayo. Si el valor de la resistencia es inferior a 10 kΩ, hay que desechar los discos restantes de la misma piel.

1.5.3. **Aplicación de las sustancias problema y de control**

En cada estudio deben utilizarse a la vez controles positivos y negativos para garantizar el funcionamiento adecuado del modelo experimental. Han de utilizarse discos de piel procedentes de un solo animal. Las sustancias de control positivo y negativo que se proponen son ácido clorhídrico 10 M y agua destilada, respectivamente.

Las sustancias problema líquidas (150 µL) se aplican uniformemente a la superficie epidérmica dentro del tubo. Cuando se prueban materias sólidas se aplica uniformemente al disco una cantidad suficiente del sólido de tal manera que quede cubierta toda la superficie de la epidermis. A continuación se vierte encima del sólido agua desionizada (150 µL) y se agita suavemente el tubo. A fin de conseguir el contacto máximo con la piel, es posible que los sólidos deban calentarse a 30 ºC para fundir o reblandecer la sustancia problema, o bien molerse para obtener polvo o material granuloso.

▼B

Para cada sustancia problema y de control se utilizan tres discos de piel. Las sustancias problema se aplican durante 24 horas a 20-23 ºC; luego se eliminan lavando con un chorro de agua del grifo a una temperatura máxima de 30 ºC, hasta que no pueda eliminarse más material.

1.5.4. **Mediciones de la RET**

La impedancia de la piel, tomada como RET, se mide con un puente de Wheatstone de corriente alterna y baja tensión (13). Las especificaciones generales del puente son una tensión de funcionamiento de 1-3 V, una corriente alterna de forma sinusoidal o rectangular de 50-1 000 Hz, y un intervalo de medición como mínimo de 0,1 a 30 kΩ. El puente utilizado en el estudio de validación media valores de inductancia, capacitancia y resistencia de hasta 2 000 H, 2 000 μF, y 2 MΩ, respectivamente, a frecuencias de 100 Hz o 1 kHz, utilizando montajes en serie o en paralelo. A efectos de la RET, las mediciones del ensayo de corrosividad se registran como resistencia, a la frecuencia de 100 Hz y utilizando montajes en serie. Antes de medir la resistencia eléctrica, se reduce la tensión superficial de la piel añadiendo el volumen suficiente de etanol al 70 % para cubrir la epidermis. Tras unos segundos se retira el etanol y después se hidrata el tejido aplicando 3 mL de una solución de $MgSO_4$ (154 mM). Los electrodos del puente se colocan a ambos lados del disco de piel para medir la resistencia en kΩ/disco de piel (figura 1). En la figura 2 se dan las dimensiones de los electrodos y la longitud del electrodo expuesta por debajo de las pinzas de cocodrilo. La pinza que sujeta el electrodo interior se apoya encima del tubo de PTFE durante la medición de la resistencia para asegurarse de que es constante la longitud del electrodo que queda sumergida en la solución de $MgSO_4$. El electrodo exterior se coloca dentro de la cámara receptora de manera que se apoye en el fondo de la misma. La distancia entre la pinza de muelle y el fondo del tubo de PTFE se ha de mantener constante (figura 2), ya que afecta al valor de la resistencia obtenido. Por tanto, la distancia entre el electrodo interior y el disco de piel debe ser constante y mínima (1-2 mm).

Si el valor medido de la resistencia es superior a 20 kΩ, puede deberse a que haya restos de la sustancia problema recubriendo la superficie epidérmica del disco de piel. Puede intentarse la eliminación de este recubrimiento, por ejemplo, sellando el tubo de PTFE con el pulgar cubierto de un guante y agitándolo aproximadamente 10 segundos; se tira la solución de $MgSO_4$ y se repite la medición de la resistencia con solución nueva de $MgSO_4$.

Las propiedades y dimensiones del instrumental y el procedimiento experimental utilizado pueden influir en los valores obtenidos de RET. El umbral de corrosión de 5 kΩ se ha determinado a partir de datos obtenidos con el instrumental y el procedimiento concretos descritos en el presente método. Si se modifican las condiciones del ensayo o se utiliza un instrumental diferente, es posible que deban aplicarse diferentes umbrales y valores de control. Por tanto, es necesario calibrar el método y los valores umbral de resistencia sometiendo a ensayo una serie de de patrones de referencia elegidos de entre las sustancias utilizadas en el estudio de validación (4) (5) o de clases químicas similares a las sustancias problema. En el cuadro 1 se ofrece un conjunto de sustancias de referencia adecuadas.

▼B

1.5.5. **Métodos de fijación de colorante**

La exposición de determinados materiales no corrosivos puede dar lugar a una reducción de la resistencia por debajo del umbral de 5 kΩ por permitir el paso de iones a través de la capa córnea, reduciendo así la resistencia eléctrica (5). Por ejemplo, los productos orgánicos neutros y las sustancias químicas que tienen propiedades tensoactivas (incluidos los detergentes, emulgentes y otros agentes tensoactivos) pueden eliminar lípidos cutáneos, lo que aumenta la permeabilidad de la barrera a los iones. Así pues, si los valores de RET de una sustancia problema están por debajo o cerca de 5 kΩ, sin que visualmente se aprecien lesiones, deberá efectuarse una evaluación de la penetración de colorante en los tejidos tratado y de control, a fin de determinar si los valores de RET obtenidos son resultado de un aumento de la permeabilidad de la piel o bien de la corrosión de esta (3) (5). En este último caso, si la capa córnea está destruida, el colorante sulforrodamina B aplicado a la superficie de la piel penetra rápidamente en el tejido subyacente y lo tiñe. Este colorante en particular es estable ante una amplia gama de sustancias y no se ve afectado por el procedimiento de extracción que se describe más abajo.

1.5.5.1. *Aplicación y eliminación del colorante sulforrodamina B*

Tras la evaluación de la RET, se retira el sulfato de magnesio del tubo y se examina cuidadosamente la piel para detectar la presencia de lesiones evidentes. Si no hay ninguna lesión evidente importante, se aplican durante 2 horas a la superficie epidérmica de cada disco de piel 150 µL de una dilución al 10 % (p/v) del colorante sulforrodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; nº EINECS 222-529-8; nº CAS 3520-42-1) en agua destilada. Después se lavan estos discos de piel con agua del grifo, durante unos 10 segundos y a temperatura no superior a la ambiente, para eliminar el exceso de colorante no fijado. Cada disco de piel se retira cuidadosamente del tubo de PTFE y se coloca en un frasco (por ejemplo, un frasco de cristal de centelleo de 20 mL) con agua desionizada (8 mL). Los frascos se agitan suavemente durante 5 minutos para eliminar los eventuales restos de colorante no fijado. Este procedimiento de aclarado se repite a continuación, después de lo cual se retiran los discos cutáneos y se colocan en frascos que contengan 5 ml de dodecilsulfato sódico (SDS) al 30 % (p/v) en agua destilada y se dejan incubar una noche a 60 ºC.

Después de la incubación, se retiran y desechan los discos de piel y la solución restante se centrifuga durante 8 minutos a 21 ºC (fuerza centrífuga relativa ~175 × g). Luego, se diluye de 1 a 5 (v/v) [es decir, 1 mL + 4 mL] una alícuota de 1 mL del sobrenadante con dodecilsulfato sódico al 30 % (p/v) en agua destilada. Se mide la densidad óptica (DO) de la solución a 565 nm.

1.5.5.2. *Cálculo del contenido de colorante*

El contenido del colorante sulforrodamina B por disco se calcula a partir de los valores de DO (5) (coeficiente de extinción molar del colorante sulforrodamina B a 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; peso molecular = 580). Se determina el contenido de colorante de cada disco de piel utilizando una curva de calibración adecuada, y después se calcula la media del contenido de colorante de las muestras paralelas.

2. **DATOS**

Deben indicarse en un cuadro los valores de resistencia (kΩ) y los valores medios de contenido de colorante (µg/disco), en su caso, correspondientes al material problema y a los controles positivos y negativos (todos los datos del ensayo y las medias ± D.T.), incluidos los datos de las muestras paralelas o de experimentos repetidos, las medias y cada uno de los valores.

▼B

2.1. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados medios de la RET se aceptan a condición de que los valores de los controles positivos y negativos correspondientes queden dentro de los intervalos aceptables para el método en el laboratorio de ensayo. Los intervalos aceptables de resistencia del método y del instrumental antes descritos se indican en el cuadro siguiente:

Control	Sustancia	Intervalo de resistencia (kΩ)
Positivo	Ácido clorhídrico 10 M	0,5-1,0
Negativo	Agua destilada	10-25

Los resultados medios de fijación del colorante se aceptan a condición de que los valores de los controles correspondientes queden dentro de los intervalos aceptables para el método. A continuación se dan los intervalos de contenido de colorante aceptables que se proponen para las sustancias de control con el método y el instrumental antes descritos:

Control	Sustancia	Intervalo del contenido de colorante (μg/disco)
Positivo	Ácido clorhídrico 10 M	40-100
Negativo	Agua destilada	15-35

Se considera que la sustancia problema no es corrosiva para la piel:

i) si el valor medio de RET de la sustancia que se ha obtenido es superior a 5 kΩ, o

ii) si el valor medio de RET es inferior o igual a 5 kΩ, y

— el disco de piel no muestra ninguna lesión evidente, y

— el contenido medio de colorante del disco está muy por debajo del contenido medio de colorante del disco del control positivo de HC1 10 M obtenido en paralelo.

Se considera que la sustancia problema es corrosiva para la piel:

i) si el valor medio de RET es inferior o igual a 5 kΩ y el disco de piel muestra lesiones evidentes, o

ii) si el valor medio de RET es inferior o igual a 5 kΩ, y

— el disco de piel no muestra ninguna lesión evidente, pero

— el contenido medio de colorante del disco es mayor o igual al contenido medio de colorante del disco del control positivo de HC1 10 M obtenido en paralelo.

▼B

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DE ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancias problema y de control:

— denominación química, como nombre IUPAC o CAS y número CAS, si se conoce,

— pureza y composición de la sustancia o preparado (en porcentaje ponderal) y naturaleza física,

— propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio, como estado físico, pH, estabilidad o hidrosolubilidad,

— tratamiento de las sustancias problema y de control antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración),

— estabilidad, si se conoce.

Animales de ensayo:

— cepa y sexo utilizados,

— edad de los animales en el momento de quitarles la piel,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— datos de la preparación de la piel.

Condiciones de los ensayos:

— curvas de calibración del instrumental del ensayo,

— curvas de calibración para el ensayo de fijación de colorante,

— características del método utilizado para las mediciones de la RET,

— características del método utilizado para la evaluación de la fijación del colorante, en su caso,

— descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo,

— descripción de los criterios de evaluación seguidos.

Resultados:

— cuadro de datos del ensayo de RET y del de fijación de colorante (en su caso) correspondientes a los distintos animales y a las distintas muestras de piel,

— descripción de los eventuales efectos observados.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

1 OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001 doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2 Método de ensayo B.4. Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

3 Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483-524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an interlaboratory trial. Toxic. in Vitro 6, 191-194.

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

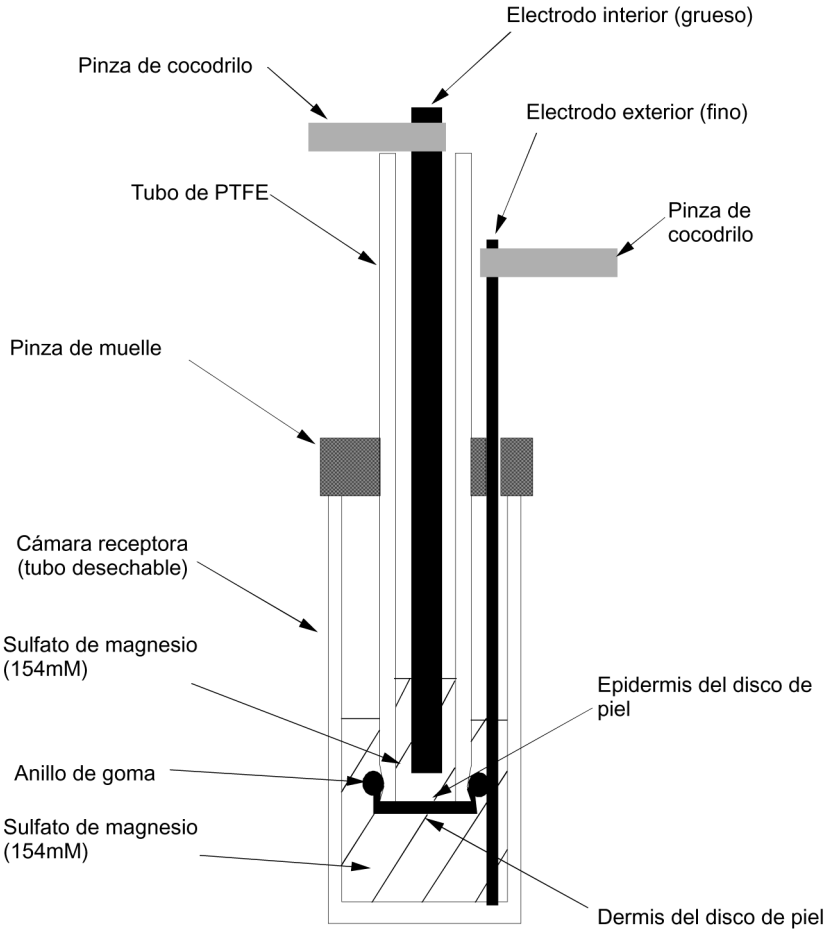
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Inicial Validation. Toxic. in Vitro. 2, 7-17.

▼B

Figura 1

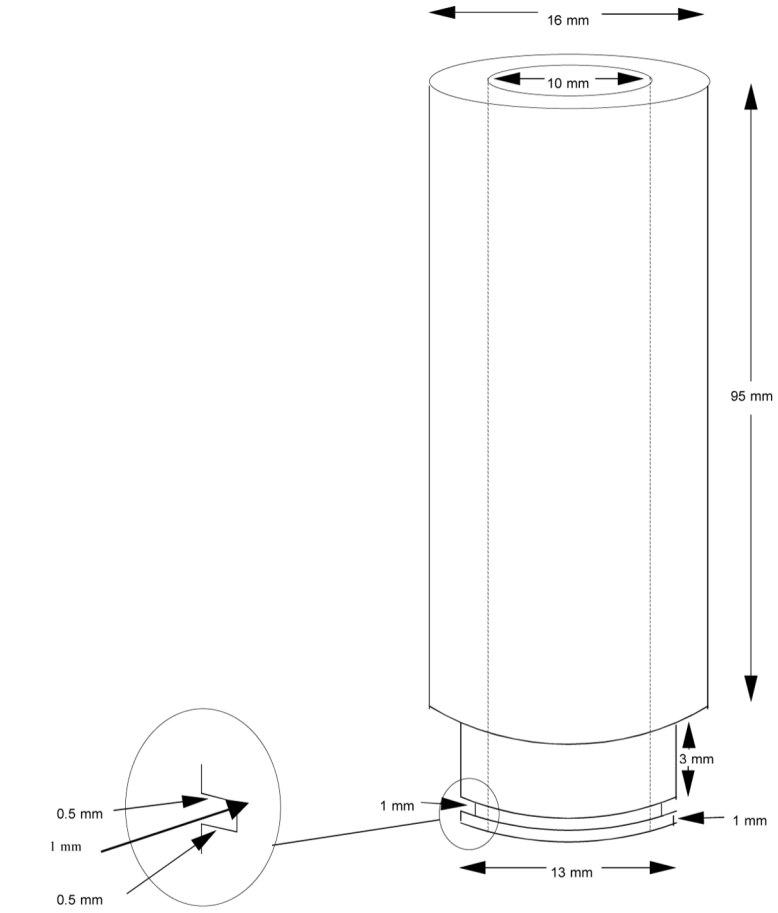
Instrumental para el ensayo de la RET en piel de rata

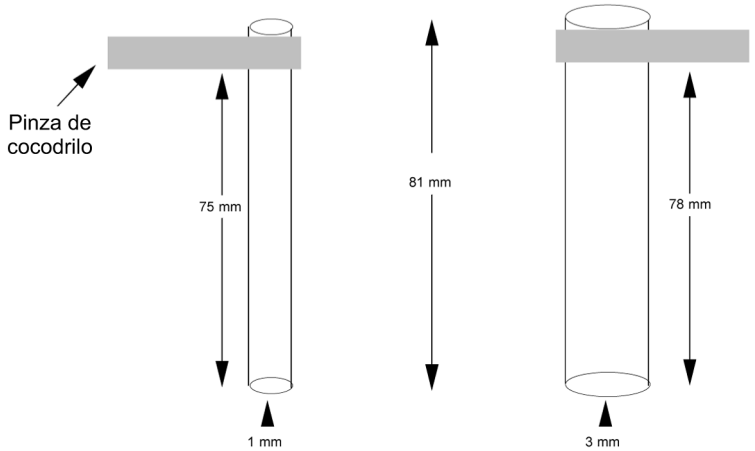


▼B

Figura 2

Dimensiones del tubo de politetrafluoretileno (PTFE), de la cámara receptora y de los electrodos usados





▼B

Factores críticos del instrumental mostrado arriba:

— el diámetro interior del tubo de PTFE,

— la longitud de los electrodos respecto al tubo de PTFE y a la cámara receptora, de forma que el disco de piel no toque los electrodos y que haya en contacto con la solución de $MgSO_4$ una longitud fijada de electrodo,

— la cantidad de solución de $MgSO_4$ presente en la cámara receptora debe hacer que el líquido tenga cierta profundidad respecto al nivel dentro del tubo de PTFE, como se indica en la figura 1,

— el disco de piel debe fijarse bien al tubo de PTFE, de forma que la resistencia eléctrica sea una medida fiel de las propiedades de la piel.

▼B

B.40 *BIS.* CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO:* ENSAYO CON MODELO DE PIEL HUMANA

1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 431(2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

La corrosión cutánea se refiere a la producción de daños tisulares irreversibles en la piel tras la aplicación de una sustancia [según la definición del Sistema Armonizado Mundial *(Globally Harmonized System,* GHS) de clasificación y etiquetado de productos químicos] (1). El presente método de ensayo no exige el uso de animales vivos ni de tejidos animales para la evaluación de la corrosividad cutánea.

Tradicionalmente, la evaluación de la corrosividad cutánea se hacía con animales de laboratorio (2). La preocupación por el dolor y el sufrimiento que implicaba esa evaluación se ha tenido en cuenta en la revisión del método de ensayo B.4, para permitir la determinación de la corrosión cutánea mediante métodos alternativos, *in vitro,* que eviten el dolor y el sufrimiento de los animales.

Un primer paso hacia la definición de métodos alternativos que se pudieran utilizar en los ensayos de corrosividad cutánea con fines normativos fue la realización de estudios de prevalidación (3). Posteriormente se llevó a cabo un estudio oficial de validación de métodos *in vitro* para evaluar la corrosión cutánea (4) (5) (6) (7) (8). Como consecuencia de estos estudios y de otros datos publicados (9), se llegó a la recomendación de que los siguientes métodos podían utilizarse para predecir el efecto corrosivo *in vivo* de la piel (10) (11) (12) (13): el ensayo con un modelo de piel humana (el presente método) y el ensayo de resistencia eléctrica transcutánea (véase el método de ensayo B.40).

Los estudios de validación han señalado que los ensayos que utilizan modelos de piel humana (3) (4) (5) (9) pueden discriminar de manera fiable entre agentes corrosivos y no corrosivos cutáneos conocidos. El protocolo del ensayo puede distinguir asimismo entre agentes corrosivos cutáneos fuertes y menos fuertes.

El ensayo descrito en el presente método permite la identificación de sustancias químicas y mezclas corrosivas. Asimismo, permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas con el apoyo de pruebas sopesadas derivadas de otro tipo de información disponible (por ejemplo, pH, relaciones estructura-actividad, datos con hombres o animales) (1) (2) (13) (14). En principio, no da información adecuada sobre la irritación cutánea ni permite la subcategorización de sustancias corrosivas que se contempla en el Sistema Armonizado Mundial de clasificación (1).

Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una única exposición de la piel, se recomienda seguir la estrategia de ensayos secuenciales que figura adjunta al método de ensayo B.4 (2) y que proporciona el Sistema Armonizado Mundial (1). Esta estrategia de ensayos incluye la realización de pruebas *in vitro* de corrosión cutánea (como las descritas en el presente método) y de irritación cutánea antes de considerar las pruebas con animales vivos.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

corrosión cutánea *in vivo* la producción de lesiones cutáneas irreversibles consistentes en necrosis visible en todo el espesor de la epidermis y hasta en la dermis, debida a la aplicación de una sustancia durante hasta 4 horas; las reacciones de corrosión se tipifican como úlceras, hemorragia, costras hemorrágicas y, hacia el final del período de observación de 14 días, como decoloración de la piel, zonas de alopecia completa y cicatrices; debe recurrirse a la histopatología para evaluar las lesiones dudosas;

viabilidad celular el parámetro que mide la actividad total de una población celular (por ejemplo, capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT), que, según el efecto que se mida y el tipo de ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Cuadro 1

Sustancias de referencia

Denominación	Nº EINECS	Nº CAS	
1,2-diaminopropano	201-155-9	78-90-0	Fuertemente corrosivo
Ácido acrílico	201-177-9	79-10-7	Fuertemente corrosivo
2-*terc*-butilfenol	201-807-2	88-18-6	Corrosivos
Hidróxido de potasio (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosivos
Ácido sulfúrico (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosivos
Ácido octanoico (ácido caprílico)	204-677-5	124-07-02	Corrosivos
4-amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	No corrosivo
Eugenol	202-589-1	97-53-0	No corrosivo
Bromuro de fenetilo	203-130-8	103-63-9	No corrosivo
Tetracloroetileno	204-825-9	27-18-4	No corrosivo
Ácido isoesteárico	250-178-0	30399-84-9	No corrosivo
4-(metiltio)-benzaldehído	222-365-7	3446-89-7	No corrosivo

La mayoría de estas sustancias proceden de la lista de sustancias seleccionadas para el estudio internacional de validación del ECVAM (4). Su elección se basa en los criterios siguientes:

i) igual número de sustancias corrosivas y no corrosivas,

ii) sustancias disponibles en el comercio y representativas de la mayoría de las clases químicas pertinentes,

iii) inclusión de sustancias fuertemente corrosivas y de sustancias menos corrosivas para permitir la discriminación según la potencia corrosiva,

▼B

iv) elección de sustancias que puedan manipularse en un laboratorio sin plantear peligros graves aparte de la corrosividad.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El material problema se aplica tópicamente a un modelo tridimensional de piel humana que comprende al menos una epidermis reconstruida con una capa córnea funcional. Los materiales corrosivos se caracterizan por su capacidad de producir una disminución de la viabilidad celular [determinada, por ejemplo, utilizando el ensayo de reducción del MTT (15)] por debajo de determinados umbrales en períodos de exposición especificados. El principio del ensayo con modelo de piel humana se basa en la hipótesis de que las sustancias corrosivas pueden penetrar en la capa córnea por difusión o erosión, y son citotóxicas para las células de las capas subyacentes.

1.4.1. **Procedimiento**

1.4.1.1. *Modelos de piel humana*

Los modelos de piel humana pueden construirse u obtenerse en el comercio (por ejemplo, los modelos EpiDerm^{MR} y EPISKIN^{MR}) (16) (17) (18) (19), o bien desarrollarse o construirse en el laboratorio de ensayo (20) (21). Se sabe que el uso de piel humana es objeto de condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales. Todo nuevo modelo debe validarse (al menos en la medida descrita en el punto 1.4.1.1.2). Los modelos de piel humana utilizados para este ensayo deben cumplir las siguientes condiciones:

1.4.1.1.1. Condiciones generales del modelo

Para construir el epitelio deben utilizarse queratinocitos humanos. Bajo una capa córnea funcional, debe haber presentes múltiples capas de células epiteliales viables. El modelo de piel puede tener asimismo una capa de componentes del estroma. La capa córnea debe constar de múltiples estratos con el perfil lipídico necesario para constituir una barrera funcional con la suficiente resistencia contra la penetración rápida de marcadores citotóxicos. Las propiedades de aislamiento del modelo deben evitar que pase material rodeando la capa córnea hasta el tejido viable. El paso de sustancias problema rodeando la capa córnea reduce la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la piel. El modelo de piel debe estar exento de contaminación por bacterias (incluidos micoplasmas) y hongos.

1.4.1.1.2. Condiciones funcionales del modelo

La magnitud de la viabilidad se cuantifica normalmente utilizando MTT o los otros colorantes vitales que se transforman en el metabolismo. En estos casos, la densidad óptica (DO) del colorante extraído (solubilizado) del tejido de control negativo debe ser al menos 20 veces mayor que la DO del disolvente de extracción solo [para una visión general, consúltese (22)]. El tejido de control negativo debe ser estable en cultivo (proporcionar unas mediciones similares de la viabilidad) durante la duración del tiempo de exposición del ensayo. La capa córnea debe tener la suficiente resistencia contra la penetración rápida de determinados marcadores citotóxicos (por ejemplo, tritón X-100 al 1 %). Esta propiedad puede estimarse mediante el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % (TE_{50}) (por ejemplo, en el caso de los modelos EpiDerm^{MR} y EPISKIN^{MR}, es > 2 horas). Los resultados obtenidos con el tejido han de poder reproducirse posteriormente y, de preferencia, en otros laboratorios. Por otra parte, el tejido ha de ser tal que permita prever el potencial corrosivo de las sustancias de referencia (véase el cuadro 1) cuando se utiliza en el protocolo de ensayo seleccionado.

▼B

1.4.1.2. *Aplicación de las sustancias problema y de control*

Por cada tratamiento (tiempo de exposición), incluidos los controles, se utilizan dos muestras de tejido. En caso de materiales líquidos, debe aplicarse una cantidad de sustancia problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie cutánea (un mínimo de 25 μL/cm^2. En caso de materiales sólidos, tiene que aplicarse uniformemente una cantidad suficiente de sustancia problema para cubrir la piel y debe humedecerse con agua desionizada o destilada para asegurar un buen contacto con la piel. Cuando convenga, deberán triturarse los sólidos para transformarlos en polvo antes de su aplicación. El método de aplicación debe ser adecuado para la sustancia problema (véase, por ejemplo, la cita bibliográfica 5). Al final del período de exposición, el material problema debe retirarse cuidadosamente de la superficie de la piel lavando con una solución amortiguadora adecuada o con NaCl al 0,9 %.

En cada estudio deben utilizarse a la vez controles positivos y negativos para garantizar el funcionamiento adecuado del modelo experimental. Las sustancias de control positivo que se proponen son ácido acético glacial o KOH 8 N. Los controles negativos propuestos son NaCl al 0,9 % o agua.

1.4.1.3. *Medición de la viabilidad celular*

Para medir la viabilidad celular solo pueden emplearse métodos cuantitativos validados. Por otra parte, la medición de la viabilidad debe ser compatible con el uso de un modelo de tejido tridimensional. La medición de la viabilidad no debe sufrir ninguna interferencia con una fijación inespecífica del colorante. Por tanto, no son adecuados los colorantes que se fijan a proteínas ni los que no se transforman en el metabolismo (por ejemplo, el rojo neutro). El ensayo más utilizado es la reducción del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo: número EINECS 206-069-5, número CAS 298-93-1)], que, según se ha demostrado, da resultados exactos y reproducibles (5), pero también pueden utilizarse otros. La muestra de piel se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (por ejemplo, 0,3-1 mg/mL), a una temperatura adecuada de incubación, durante 3 horas. A continuación, utilizando un disolvente (isopropanol), se extrae el precipitado que se produce de formazano azul y se mide la concentración de formazano determinando la DO a una longitud de onda entre 540 y 595 nm.

Es posible que la acción química de la sustancia problema sobre el colorante vital imite a la del metabolismo celular, provocando una estimación falsa de la viabilidad. Se ha visto que esto sucede cuando una sustancia problema de este tipo no se elimina completamente de la piel mediante lavado (9). Si la sustancia problema actúa directamente sobre el colorante vital, deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir la interferencia de la sustancia problema con la medición de la viabilidad (9) (23).

2. **DATOS**

Respecto a cada tejido, deben recogerse en un cuadro los valores de DO y los porcentajes calculados de viabilidad celular de la sustancia problema y de los controles positivo y negativo, incluidos los datos de los experimentos repetidos paralelos en su caso, con cada uno de los valores obtenidos y la media.

▼B

2.1. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los valores de DO obtenidos con cada muestra problema pueden utilizarse para calcular un porcentaje de viabilidad respecto al control negativo, que se fija arbitrariamente en el 100 %. Es necesario definir claramente y documentar, así como demostrar que es adecuado, el porcentaje límite de viabilidad celular que permite distinguir entre sustancias problema corrosivas y no corrosivas (o discriminar entre diferentes tipos de sustancias corrosivas), o el método o métodos estadísticos utilizados para evaluar los resultados y señalar las sustancias corrosivas. En general, estos valores límite se establecen durante la fase de optimización del ensayo, se prueban durante una fase de prevalidación y se confirman en un estudio de validación. Como ejemplo, la predicción de corrosividad asociada con el modelo EpiDerm^{MR} es la siguiente (9):

Se considera que la sustancia problema es corrosiva para la piel:

i) si la viabilidad tras 3 minutos de exposición es inferior al 50 %, o

ii) si la viabilidad tras 3 minutos de exposición es superior o igual al 50 % y la viabilidad tras una hora de exposición es inferior al 15 %.

Se considera que la sustancia problema no es corrosiva para la piel:

i) si la viabilidad tras 3 minutos de exposición es superior o igual al 50 % y la viabilidad tras una hora de exposición es superior o igual al 15 %.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DE ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancias problema y de control:

— denominación química, como nombre IUPAC o CAS y número CAS, si se conoce,

— pureza y composición de la sustancia o preparado (en porcentaje ponderal),

— propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio, como estado físico, pH, estabilidad, hidrosolubilidad;

— tratamiento de las sustancias problema y de control antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración),

— estabilidad, si se conoce.

Justificación del modelo de piel y del protocolo utilizados.

Condiciones de ensayo:

— sistema celular utilizado,

— información sobre la calibración del aparato utilizado para medir la viabilidad celular (por ejemplo, espectrofotómetro),

▼B

— información complementaria completa sobre el modelo concreto de piel utilizado, incluida su validez,

— particularidades del procedimiento de ensayo empleado,

— dosis utilizadas en el ensayo,

— descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo,

— referencia a datos anteriores del modelo,

— descripción de los criterios de evaluación seguidos.

Resultados:

— cuadro de datos de las distintas muestras problema,

— descripción de otros efectos observados.

Discusión de los resultados.

Conclusión.

4. **REFERENCIAS**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/200 1doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23,219- 255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in Vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro 12, 483-524.*

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.

10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889-891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post -transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193:310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. In *Vitro* 15, 57-93.

▼B

B.41. ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD *IN VITRO* 3T3 ARN (ABSORCIÓN DE ROJO NEUTRO)

1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 432 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

La fototoxicidad se define como una respuesta tóxica ante una sustancia aplicada al cuerpo que es provocada o aumentada (se hace perceptible a dosis menores) tras una exposición posterior a la luz, o que es inducida por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia.

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN se emplea para identificar el potencial fototóxico de una sustancia problema inducido por la sustancia excitada tras su exposición a la luz. El ensayo evalúa la fototoxicidad mediante la reducción relativa de la viabilidad de las células expuestas a la sustancia en presencia de luz, respecto a las expuestas en la oscuridad. Es probable que las sustancias identificadas mediante este ensayo sean fototóxicas *in vivo,* tras su aplicación sistémica seguida de su distribución a la piel, o tras una aplicación tópica.

Se han señalado numerosos tipos de sustancias químicas que producen efectos fototóxicos (1) (2) (3) (4). Tienen en común la capacidad de absorber energía luminosa del espectro de la luz solar. Con arreglo a la primera ley de la fotoquímica (ley de Grotthaus-Draper), para que se produzca una fotorreacción es necesaria la absorción suficiente de cuantos de luz. Por tanto, antes de plantearse la realización de ensayos biológicos, debe determinarse el espectro de absorción de luz UV/visible de la sustancia problema según las directrices de ensayo TG 101 de la OCDE. Se ha indicado la escasa probabilidad de que una sustancia sea fotorreactiva si su coeficiente de absorción/extinción molar es inferior a 10 litros × mol^{-1} × cm^{-1}. Es posible que las sustancias de este tipo no tengan que someterse al ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN ni a ningún otro ensayo biológico de efectos fotoquímicos adversos (1) (5). Véase también a este respecto el anexo 1.

La fiabilidad y la pertinencia del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN se han evaluado recientemente (6) (7) (8) (9). Se ha comprobado que este ensayo sirve para predecir los efectos de fototoxicidad aguda *in vivo* en animales y en el hombre. Por el contrario, no está concebido para predecir otros efectos adversos que puedan deberse a la acción combinada de una sustancia y de la luz; así, por ejemplo, no se refiere a la fotogenotoxicidad, a la fotoalergia ni a la fotocarcinogénesis, y tampoco permite la evaluación de la potencia fototóxica. Tampoco se ha designado el ensayo para estudiar mecanismos indirectos de fototoxicidad, efectos de metabolitos de la sustancia problema ni efectos de mezclas.

Si bien en general es necesario utilizar sistemas de metabolización en todos los ensayos *in vitro* de predicción del potencial genotóxico o carcinogénico, en el caso de la fototoxicología hasta la fecha solo se conocen escasos ejemplos de que una sustancia química requiera una transformación metabólica para actuar como fototoxina *in vivo* o *in vitro.* Por consiguiente, no resulta necesario ni está fundado científicamente realizar el presente ensayo con un sistema de activación metabólica.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

irradiancia la intensidad de luz ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, medida en W/m^2 o mW/cm^2;

dosis de luz la cantidad (= intensidad × tiempo) de radiación ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, expresada en julios (= W × s) por unidad de superficie, por ejemplo J/m^2 o J/cm^2;

bandas de luz UV las siguientes designaciones recomendadas por la CIE *(Commission Internationale de l'Eclairage):* UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm); también se emplean otras designaciones: la separación entre UVB y UVA se sitúa con frecuencia en 320 nm y las radiaciones UVA pueden subdividirse en UV-A1 y UV-A2, con una separación a 340 nm aproximadamente;

viabilidad celular el parámetro que mide la actividad total de una población celular (por ejemplo, absorción del colorante vital rojo neutro por los lisosomas celulares), que, según el efecto que se mida y el tipo de ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células;

viabilidad celular relativa la viabilidad celular respecto a la de los controles negativos (disolvente) que se someten a todo el procedimiento de ensayo (+ Irr o - Irr), pero no se tratan con la sustancia problema;

PIF *(Photo Irritation Factor* — factor de fotoirritación) el factor que se obtiene comparando dos concentraciones citotóxicas igualmente eficaces (CI50) de la sustancia problema con irradiación no citotóxica de luz UVA/visible (+ Irr) y sin dicha irradiación (- Irr);

CI_{50} la concentración de la sustancia problema a la que la viabilidad celular se reduce en un 50 %;

MPE *(Mean Photo Effect* — fotoefecto medio) la medida derivada del análisis matemático de las curvas respuesta-concentración obtenidas con una irradiación no citotóxica de luz UVA/visible (+ Irr) y sin dicha irradiación (- Irr);

fototoxicidad la reacción tóxica aguda provocada tras una primera exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o inducida análogamente por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN se basa en la comparación de la citotoxicidad de una sustancia cuando se somete a ensayo con exposición y sin exposición a una dosis no citotóxica de luz solar simulada. La citotoxicidad en este ensayo se expresa como la disminución, ligada a la concentración, de la absorción del colorante vital rojo neutro a las 24 horas de la administración de la sustancia problema y la irradiación (10). El rojo neutro es un colorante catiónico débil que penetra fácilmente a través de las membranas celulares por un mecanismo distinto de la difusión, y se acumula intracelularmente en los lisosomas. Las alteraciones de la superficie de la sensible membrana de los lisosomas provocan un aumento de la fragilidad de estos, junto con otros cambios que gradualmente se van haciendo irreversibles. Tales cambios inducidos por la acción de agentes xenobióticos ocasionan un descenso de la absorción y fijación del rojo neutro, con lo que es posible distinguir entre células viables, lesionadas y muertas, lo que constituye la base del ensayo.

▼B

Se mantienen en cultivo células Balb/c 3T3 durante 24 horas para que se formen monocapas. Se preincuban durante 1 hora dos placas de 96 pocillos por sustancia problema, con 8 concentraciones diferentes de esta sustancia. Después se expone una de las dos placas a la dosis máxima de irradiación no citotóxica, mientras que la otra placa se mantiene a oscuras. A continuación se sustituye en ambas placas el medio de tratamiento por medio de cultivo y, tras otras 24 horas de incubación, se determina la viabilidad celular mediante la absorción de rojo neutro. La viabilidad celular se expresa en porcentaje respecto a los controles de disolvente sin tratar y se calcula para cada una de las concentraciones del ensayo. Para predecir el potencial fototóxico, se comparan las respuestas a las distintas concentraciones obtenidas con y sin irradiación, por lo general al nivel CI_{50}, es decir, a la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50 % respecto a los controles sin tratar.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Células*

En el estudio de validación se utilizó una línea celular de fibroblastos permanentes de ratón, la Balb/c 3T3, clon 31, bien de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA, EEUU, o bien de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Salisbury, Wiltshire, RU, por lo que se recomienda obtenerla de una colección reconocida. También pueden utilizarse con el mismo protocolo de ensayo otras células o líneas celulares, siempre y cuando las condiciones de cultivo se adapten a las necesidades particulares de las células, si bien en tal caso debe demostrarse la equivalencia de los resultados.

Debe comprobarse periódicamente que las células están libres de contaminación por micoplasmas y solo se utilizarán si se confirma la ausencia de estos microorganismos (11).

Es importante comprobar periódicamente la sensibilidad de las células a las radiaciones UV conforme al procedimiento de control de calidad descrito en el presente método. Dado que la sensibilidad de las células a las radiaciones UVA puede aumentar con el número de pases, deben emplearse células Balb/c 3T3 sometidas al menor número posible de pases, preferentemente menos de 100. (Véanse el punto 1.4.2.2.2 y el anexo 2).

1.4.1.2. *Medios y condiciones de cultivo*

Deben emplearse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados para los pases celulares corrientes y durante el ensayo; por ejemplo, en el caso de células Balb/c 3T3, el medio de cultivo es DMEM *(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)* enriquecido con un 10 % de suero de ternera recién nacida, glutamina 4 mM, penicilina (100 UI) y estreptomicina (100 μg/ml), y la incubación ha de hacerse en atmósfera humidificada, a 37 ºC, con 5-7,5 % de CO_2 según el amortiguador (véase el segundo párrafo del punto 1.4.1.4). Es particularmente importante que las condiciones del cultivo celular permitan mantener la duración del ciclo celular dentro de los límites normales conocidos de la línea celular o las células utilizadas.

1.4.1.3. *Preparación de los cultivos*

Se siembran en medio de cultivo, a una densidad apropiada, células procedentes de cultivos madre congelados y se subcultivan al menos una vez antes de utilizarlas en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN.

▼B

Para el ensayo de fototoxicidad, las células se siembran en el medio de cultivo a una densidad apropiada de manera que los cultivos no confluyan antes de que finalice el ensayo, es decir, cuando se determine la viabilidad celular 48 horas después de la siembra celular. Para las células Balb/c 3T3 cultivadas en placas de 96 pocillos, se recomienda una densidad de siembra de 1×10^4 células por pocillo.

Por cada sustancia problema se siembran las células de igual modo en dos placas distintas de 96 pocillos, que se mantendrán en paralelo en condiciones de cultivo idénticas a lo largo de todo el ensayo, excepto durante el tiempo en que una de ellas se irradia (+ Irr) y la otra se mantiene en la oscuridad (- Irr).

1.4.1.4. *Preparación de la sustancia problema*

Las sustancias problema deben prepararse justo antes de su empleo, salvo que se disponga de datos que demuestren que pueden conservarse estables. Se recomienda efectuar todas las manipulaciones químicas y el tratamiento inicial de las células en unas condiciones luminosas que eviten la fotoactivación o la degradación de la sustancia problema antes de la irradiación.

Las sustancias problema se disuelven en soluciones salinas amortiguadoras, como la solución salina equilibrada de Earle *(Earle's Balanced Salt Solution,* EBSS) u otras soluciones amortiguadoras equilibradas fisiológicamente, que no deben contener componentes proteínicos ni absorbentes de la luz (por ejemplo, colorantes indicadores de pH y vitaminas), con el fin de evitar interferencias durante la irradiación. Como durante la irradiación las células se mantienen unos 50 minutos fuera de la incubadora de CO_2, debe tenerse cuidado para evitar la alcalinización. Si se utilizan amortiguadores débiles, como la EBSS, esto puede conseguirse incubando las células con un 7,5 % de CO_2. Si las células se incuban solo con un 5 % de CO_2, debe elegirse un amortiguador más fuerte.

Las sustancias problema de hidrosolubilidad limitada deben disolverse en un disolvente adecuado. Si se emplea un disolvente, debe encontrarse a un volumen constante en todos los cultivos, es decir, en los controles negativos (disolvente) y en todas las concentraciones de la sustancia problema, y a esa concentración no debe ser citotóxico. Las concentraciones de la sustancia problema deben elegirse de manera que se evite la aparición de precipitados o de turbidez.

Se recomienda el uso de los disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol (EtOH). También pueden ser útiles otros disolventes de baja citotoxicidad. Antes de utilizar cualquier disolvente, hay que comprobar ciertas propiedades del mismo como, por ejemplo, su capacidad de reacción con la sustancia problema, de atenuación del efecto fototóxico, de captación de radicales, o la estabilidad de la sustancia en el disolvente.

Para facilitar la solubilización puede utilizarse un agitador mecánico, un baño de ultrasonidos o el calentamiento a temperatura adecuada, siempre que no se altere la estabilidad de la sustancia problema.

▼B

1.4.1.5. *Condiciones de irradiación*

1.4.1.5.1. Fuente luminosa

En el ensayo de fototoxicidad, es fundamental la elección de una fuente luminosa y de unos filtros adecuados. La luz de las regiones visible y UVA suele relacionarse con reacciones fototóxicas *in vivo* (3) (12), mientras que generalmente la UVB reviste menor importancia pero es muy citotóxica; la citotoxicidad se multiplica por 1 000 cuando la longitud de onda pasa de 313 a 280 nm (13). Entre los criterios para elegir una fuente luminosa adecuada debe figurar el requisito de que esta emita longitudes de onda absorbidas por la sustancia problema (espectro de absorción) y que la dosis de luz (conseguida en un tiempo de exposición razonable) sea suficiente para detectar sustancias fotocitotóxicas conocidas. Además, las longitudes de onda y las dosis empleadas no han de ser excesivamente nocivas para el sistema de ensayo, por ejemplo debido a la emisión de calor (región del infrarrojo).

Se considera que la mejor fuente luminosa artificial son los simuladores solares. La distribución de potencia de irradiación del simulador solar filtrado debe parecerse a la de la luz diurna al aire libre que se indica en (14). Se utilizan como simuladores solares tanto los arcos de xenón como los arcos de haluro metálico y mercurio (cebado) (15). Estos últimos presentan la ventaja de emitir menos calor y de ser más baratos, pero no reproducen la luz solar tan bien como los arcos de xenón. Dado que todos los simuladores solares emiten cantidades importantes de rayos UVB, deben emplearse los filtros adecuados para atenuar estas longitudes de onda altamente citotóxicas. Debido a que el material plástico para cultivo celular contiene estabilizadores de UV, el espectro debe medirse a través del mismo tipo de tapa de placa de 96 pocillos que se vaya a utilizar en el ensayo. Independientemente de las medidas tomadas para atenuar partes del espectro mediante filtración o mediante efectos filtrantes inevitables del equipo, el espectro registrado por debajo de estos filtros no debe desviarse de la luz diurna al aire libre normalizada (14). En (8) y (16) se recoge un ejemplo de la distribución de la irradiancia espectral del simulador solar con filtro utilizado en el estudio de validación del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN. Véase también la figura 1 del anexo 2.

1.4.1.5.2. Dosimetría

La intensidad de la luz (irradiancia) debe comprobarse periódicamente antes de cada ensayo de fototoxicidad utilizando un medidor adecuado de UV de banda ancha. La intensidad debe medirse a través del mismo tipo de tapa de placa de 96 pocillos que se vaya a utilizar en el ensayo. El medidor de UV tiene que haberse calibrado en función de la fuente luminosa. Ha de comprobarse el correcto funcionamiento de dicho aparato, para lo cual se recomienda utilizar otro medidor de UV de referencia, del mismo tipo y calibrado de igual manera. Lo ideal, a intervalos mayores, sería emplear un espectrorradiómetro para medir la irradiancia espectral de la fuente luminosa filtrada y comprobar el calibrado del medidor de UV de banda ancha.

Se ha visto que una dosis de 5 J/cm^2 (medida en la región UVA) no es citotóxica para las células Balb/c 3T3 y tiene la potencia suficiente de excitación de sustancias químicas para producir reacciones fototóxicas (6) (17), por ejemplo para conseguir 5 J/cm^2 dentro de un plazo de 50 min, se ajustó la irradiancia a 1,7 mW/cm^2. Véase la figura 2 del anexo 2. Si se utiliza otra línea celular o una fuente luminosa diferente, es posible que la dosis de irradiación haya de calibrarse de manera que pueda elegirse un régimen de dosis inocuas para las células pero suficientes para excitar fototoxinas de referencia. La duración de la exposición a la luz se calcula de la manera siguiente:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dosis de irradiación } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiancia } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\ J = 1\ Ws)$$

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Concentraciones de la sustancia problema*

Las gamas de concentraciones de la sustancia estudiada en presencia (+ Irr) y en ausencia (- Irr) de luz deben determinarse de forma adecuada mediante experimentos destinados a este fin. Puede ser útil evaluar la solubilidad al principio y a los 60 minutos (o el tiempo correspondiente al tratamiento que se vaya a utilizar), ya que la solubilidad puede cambiar a lo largo del tiempo o durante el proceso de exposición. Para evitar la toxicidad debida a unas condiciones de cultivo inadecuadas o a la presencia de sustancias muy ácidas o alcalinas, el pH de los cultivos celulares con la sustancia problema debe situarse entre 6,5 y 7,8.

La concentración máxima de la sustancia problema debe respetar las condiciones fisiológicas de la prueba; por ejemplo, han de evitarse las tensiones osmóticas y de pH. Según la sustancia problema, puede ser necesario estudiar otras propiedades físico-químicas como posibles factores de limitación de la concentración máxima. Cuando se trate de sustancias relativamente insolubles que no sean tóxicas a concentraciones de hasta el punto de saturación, debe utilizarse la concentración máxima que se pueda conseguir. En general, debe evitarse la precipitación de la sustancia problema en cualquiera de las concentraciones del ensayo. La concentración máxima de una sustancia problema no debe superar los 1 000 μg/ml y la osmolaridad no debe pasar de 10 mmolar. Debe utilizarse una serie de diluciones geométricas de 8 concentraciones de la sustancia problema con un factor de dilución constante (véase el punto 2.1, párrafo segundo).

Si se sabe (por un experimento de determinación de la gama de concentraciones) que la sustancia problema no es citotóxica hasta la concentración límite en el experimento sin luz (- Irr), pero es muy citotóxica cuando se ha irradiado (+ Irr), la gama de concentraciones que debe seleccionarse para el experimento (+ Irr) puede ser diferente de la elegida para el experimento (- Irr) a fin de cumplir los requisitos de calidad de los datos.

1.4.2.2. *Controles*

1.4.2.2.1. Sensibilidad de las células ante la radiación; obtención de datos previos

Debe comprobarse periódicamente (más o menos, cada cinco pases) la sensibilidad de las células ante la fuente luminosa, evaluando su viabilidad tras la exposición a dosis crecientes de radiación. En esta evaluación deben utilizarse varias dosis de radiación, incluyendo dosis sustancialmente más elevadas que las utilizadas en el ensayo de toxicidad 3T3 ARN. Lo más fácil es cuantificar estas dosis por mediciones de la banda UV de la fuente luminosa. Las células se siembran a la densidad utilizada en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN y se irradian al día siguiente. La viabilidad de las células se determina un día después mediante la absorción de rojo neutro. Debe demostrarse que la dosis máxima no citotóxica obtenida (por ejemplo, en el estudio de validación: 5 J/cm^2 [UVA]) es suficiente para clasificar correctamente las sustancias de referencia (cuadro 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilidad ante la radiación; comprobación del ensayo en curso

El ensayo cumple los criterios de calidad si los controles negativos/de disolvente irradiados presentan una viabilidad superior al 80 % respecto a los controles negativos/de disolvente no irradiados.

1.4.2.2.3. Viabilidad de los controles de disolvente

La densidad óptica absoluta ($DO_{540\ ARN}$) del rojo neutro extraído de los controles de disolvente indica si las 1×10^4 células sembradas por pocillo han crecido con un tiempo de generación normal durante los dos días del ensayo. Un ensayo cumple los criterios de aceptación si la media de la $DO_{540\ ARN}$ de los controles sin tratar es > 0,4 (es decir, unas 20 veces la absorbancia de fondo del disolvente).

1.4.2.2.4. Control positivo

Por cada ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN, debe someterse a ensayo en paralelo una sustancia fototóxica conocida. Se recomienda el uso de la clorpromazina (CPZ). Se han definido los criterios de aceptación siguientes para el uso de CPZ conforme al protocolo normalizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN: CPZ irradiada (+ Irr), CI_{50} = 0,1 a 2,0 μg/ml; CPZ no irradiada (- Irr), CI_{50} = 7,0 a 90,0 μg/ml. El factor de fotoirritación (PIF) debe ser > 6. Deben supervisarse los datos previos sobre el comportamiento del control positivo.

En lugar de la clorpromazina, pueden emplearse para los controles positivos en paralelo otras sustancias fototóxicas que convengan a la clase química o a las características de solubilidad de la sustancia estudiada.

1.4.3. **Procedimiento del ensayo (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *1er día*

Se ponen 100 μl de medio de cultivo en los pocillos periféricos de una placa de microvaloración de cultivo tisular de 96 pocillos (= blancos). En los demás pocillos se vierten 100 μl de una suspensión de $1 \times l0^5$ células/ml en medio de cultivo (= 1×10^4 células/pocillo). Deben prepararse dos placas con cada serie de concentraciones de las distintas sustancias problema, así como de los controles positivos y de disolvente.

Se incuban las células durante 24 horas (véase el punto 1.4.1.2) hasta que formen una monocapa semiconfluyente. Este período de incubación permite la recuperación, la adherencia y el crecimiento exponencial de las células.

1.4.3.2. *2o día*

Tras la incubación, se decanta el medio de cultivo separándolo de las células y se lava cuidadosamente con 150 μl de la solución amortiguadora utilizada para la dilución. Se añaden 100 μl de la solución amortiguadora con la concentración adecuada de la sustancia problema o del disolvente (control de disolvente). Se utilizan 8 concentraciones distintas de la sustancia problema. Se incuban las células con la sustancia problema en la oscuridad durante 60 minutos (véanse el punto 1.4.1.2 y el punto 1.4.1.4, segundo párrafo).

De las dos placas preparadas con cada serie de concentraciones de la sustancia problema y con los controles, se elige una, generalmente al azar, para la determinación de la citotoxicidad (- Irr) (es decir, la placa de control), y otra (la placa de tratamiento) para la determinación de la fotocitotoxicidad (+ Irr).

▼B

Para efectuar la exposición + Irr, se someten las células a la dosis máxima de radiación que no es citotóxica, durante 50 minutos, a través de la tapa de la placa de 96 pocillos, a temperatura ambiente (véase también el anexo 2). Las placas que no se irradian (- Irr) se mantienen a temperatura ambiente en la oscuridad durante 50 minutos (= tiempo de exposición a la luz).

Se decanta la solución de ensayo y se lava cuidadosamente dos veces con 150 µl de la solución amortiguadora utilizada para la incubación, pero sin sustancia problema. Se sustituye la solución amortiguadora por medio de cultivo y se incuban (véase el punto 1.4.1.2.) hasta el día siguiente (18-22 horas).

1.4.3.3. *3er día*

1.4.3.3.1. Evaluación microscópica

Deben examinarse las células atendiendo a su crecimiento y morfología, así como a la integridad de la monocapa, utilizando un microscopio de contraste de fase. Deben registrarse los cambios en la morfología y los efectos sobre el crecimiento de las células.

1.4.3.3.2. Ensayo de absorción de rojo neutro

Se lavan las células con 150 µl de solución amortiguadora previamente calentada. Se elimina la solución de lavado con unos golpecitos suaves. Se añaden 100 µl de una solución de 50 µg/ml de rojo neutro (RN) (clorhidrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, número EINECS 209-035-8; número CAS 553-24-2; C.I. 50040) en medio de cultivo sin suero (16) y se incuba durante 3 horas como se indica en el punto 1.4.1.2. Tras la incubación, se elimina el medio de RN y se lavan las células con 15 µL de la solución amortiguadora. Se decanta y se elimina el exceso de solución amortiguadora con material absorbente o por centrifugación.

Se añaden exactamente 150 µl de solución de desorción de RN (recién preparada con 49 partes de agua + 50 partes de etanol + 1 parte de ácido acético).

Se agita suavemente la placa de microvaloración en un agitador de placas durante 10 minutos, hasta que el RN se haya extraído de las células y forme una solución homogénea.

Se mide la densidad óptica del extracto de RN a 540 nm en un espectrofotómetro, utilizando los blancos como referencia. Los datos se conservan en un archivo electrónico adecuado para su análisis posterior.

2. **DATOS**

2.1. CALIDAD Y CANTIDAD DE LOS RESULTADOS

Los datos del ensayo deben permitir el análisis significativo de la relación respuesta-oncentración con y sin irradiación, y, a ser posible, determinar la concentración de la sustancia problema a la que se reduce al 50 % la viabilidad de las células (CI_{50}). Si se comprueba que hay citotoxicidad, tanto la gama de concentraciones como el intervalo entre las distintas concentraciones deben establecerse de manera que se pueda ajustar una curva a los datos experimentales.

En caso de resultados tanto claramente positivos como claramente negativos (véase el punto 2.3, párrafo primero), puede ser suficiente el experimento primario, con el apoyo de uno o más experimentos previos para determinar la gama de las dosis.

▼B

En caso de resultados ambiguos, en el límite o dudosos deben hacerse más ensayos (véase también el punto 2.4, párrafo segundo). En tal caso, debe plantearse la modificación de las condiciones experimentales. Entre las condiciones que podrían modificarse figuran la gama de concentraciones o sus intervalos, el tiempo de preincubación y la duración de la exposición a la radiación. En el caso de las sustancias inestables en el agua puede ser conveniente reducir dicha duración.

2.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para permitir la evaluación de los resultados, puede calcularse el factor de fotoirritación (PIF) o el fotoefecto medio (MPE).

Para calcular las medidas de fotocitotoxicidad (véase más abajo) hay que trazar una curva continua y adecuada respuesta-concentración (modelo) que se aproxime al conjunto de valores discretos de respuestas a las concentraciones. El ajuste de la curva a los datos se suele hacer mediante un método de regresión no lineal (18). Para evaluar la influencia de la variabilidad de los datos sobre la curva ajustada se recomienda un procedimiento *bootstrap*.

El factor de fotoirritación (PIF) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Si no puede calcularse la CI_{50} en presencia o en ausencia de luz, no es posible determinar el PIF de la sustancia problema. El fotoefecto medio (MPE) se basa en la comparación de las curvas completas respuesta-concentración (19). Se define como la media ponderada de un conjunto representativo de valores de fotoefecto.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

El fotoefecto PE_c a una concentración C se define como el producto del efecto de respuesta RE_c por el efecto de dosis DE_c; es decir, $PE_c = RE_c \times DE_c$. El efecto de respuesta RE_c es la diferencia entre las respuestas observadas en ausencia y en presencia de luz, es decir $RE_c = R_c$ (- Irr) — R_c (+ Irr). El efecto de dosis viene dado por la fórmula siguiente:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

donde C* representa la concentración equivalente, es decir, la concentración a la que la respuesta + Irr iguala a la respuesta - Irr a la concentración C. Si C* no puede determinarse porque los valores de respuesta de la curva + Irr son sistemáticamente más altos o más bajos que RC(- Irr), el efecto de dosis se fija en 1. Los factores de ponderación w_i vienen dados por el valor máximo de respuesta, es decir, $w_i = MAX \{R_i (+ Irr), R_i (- Irr)\}$. El cuadro de concentraciones C_i se elige de forma que caiga el mismo número de puntos en cada uno de los intervalos de concentración definidos por los valores de concentración utilizados en el experimento. El cálculo del MPE se limita al valor máximo de concentración al que al menos una de las dos curvas sigue mostrando un valor de respuesta de al menos el 10 %. Si esta concentración máxima es más elevada que la concentración más alta utilizada en el experimento + Irr, la parte residual de la curva + Irr se fija en el valor de respuesta «0». En función de que el valor de MPE sea o no mayor que un valor límite adecuadamente elegido ($MPE_c = 0{,}15$), la sustancia se clasifica como fototóxica o no.

▼B

En la referencia (20) puede obtenerse un programa informático para el cálculo de PIF y MPE.

2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Según el estudio de validación (8), una sustancia problema con un PIF < 2 o un MPE < 0,1 no es fototóxica. Un PIF > 2 y < 5 o un MPE > 0,1 y < 0,15 indica fototoxicidad probable, y un PIF > 5 o un MPE > 0,15 indica fototoxicidad.

Cualquier laboratorio que efectúe este ensayo por primera vez debe hacerlo con las sustancias de referencia del cuadro 1 antes de proceder al ensayo de la fototoxicidad de sustancias problema. Los valores de PIF o MPE deben ser similares a los valores indicados en el cuadro 1.

Cuadro 1

Nombre químico	Nº EINECS	Nº CAS	PIF	MPE	Pico de absorción	Disolvente ([1])
Amiodarona HCl	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (hombro)	etanol
Clorpromazina HCl	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
Norfloxacina	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitrilo
Antraceno	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitrilo
Protoporfirina IX, disodio	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-histidina		[7006-35-1]	sin PIF	0,05-0,10	211 nm	agua
Hexaclorofeno	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (hombro)	etanol
Laurilsulfato de sodio	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	sin absorción	agua

([1]) Disolvente utilizado para medir la absorción.

2.4. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Si se observan efectos fotocitotóxicos solo a la mayor concentración de ensayo (especialmente en caso de sustancias problema hidrosolubles), para la evaluación del peligro puede ser necesario tener en cuenta otros aspectos, entre los que se pueden incluir datos sobre la absorción cutánea y la acumulación de la sustancia en la piel, así como datos procedentes de otros ensayos, como el del efecto de la sustancia *in vitro* sobre piel humana o animal, o sobre modelos de piel.

▼B

Si no se pone de manifiesto ningún efecto tóxico (+ Irr y - Irr) y si la baja solubilidad limita las concentraciones que se pueden utilizar en el ensayo, puede dudarse de la compatibilidad de la sustancia problema con el ensayo y ha de estudiarse la posibilidad de efectuar un ensayo de confirmación, por ejemplo con otro modelo.

3. **INFORMES**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— identificación, nombres genéricos comunes y números IUPAC y CAS, si se saben,

— naturaleza física y pureza,

— propiedades físico-químicas importantes para la realización del estudio,

— espectro de absorción UV/visible,

— estabilidad y fotoestabilidad, si se conocen.

Disolvente:

— justificación de la elección del disolvente,

— solubilidad de la sustancia problema en el disolvente,

— porcentaje de disolvente presente en el medio de tratamiento.

Células:

— tipo y procedencia,

— ausencia de micoplasmas,

— número de pases celulares, si se conoce;

— sensibilidad de las células a la radiación, determinada con el equipo de irradiación utilizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN.

Condiciones de la prueba (1); *incubación antes y después del tratamiento:*

— tipo y composición del medio de cultivo,

— condiciones de incubación (concentración de CO_2, temperatura y humedad),

— duración de la incubación (antes y después del tratamiento).

Condiciones de la prueba (2); *tratamiento con la sustancia:*

— fundamento de la elección de las concentraciones de la sustancia problema empleadas en presencia y en ausencia de radiación,

— en caso de que la sustancia problema sea escasamente soluble y no sea citotóxica: fundamento de la elección de la mayor concentración empleada,

— tipo y composición del medio de tratamiento (solución salina amortiguadora),

— duración del tratamiento con la sustancia.

Condiciones de la prueba (3); *irradiación:*

— fundamento de la elección de la fuente luminosa empleada,

▼B

— fabricante y tipo de la fuente luminosa y del radiómetro,

— características de la irradiancia espectral de la fuente luminosa,

— características de transmisión y absorción del filtro o filtros utilizados,

— características del radiómetro y condiciones de calibrado,

— distancia entre la fuente luminosa y el sistema de ensayo,

— irradiancia UVA a esa distancia, expresada en mW/cm^2,

— duración de la exposición a la luz UV/visible,

— dosis de radiación UVA (irradiancia × tiempo), expresada en J/cm^2,

— temperatura de los cultivos celulares durante su irradiación y de los mantenidos en la oscuridad en paralelo.

Condiciones de la prueba (4); *ensayo de viabilidad con rojo neutro:*

— composición del medio de tratamiento para el ensayo con rojo neutro,

— duración de la incubación con rojo neutro,

— condiciones de incubación (concentración de CO_2, temperatura y humedad),

— condiciones de extracción del rojo neutro (agente de extracción, duración),

— longitud de onda empleada para la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica del rojo neutro,

— segunda longitud de onda (referencia), si procede,

— contenido del blanco del espectrofotómetro, si procede.

Resultados:

— viabilidad celular obtenida con cada concentración de la sustancia problema, expresada en porcentaje de la viabilidad media de los controles con disolventes en paralelo,

— curvas respuesta-concentración (viabilidad celular relativa frente a la concentración de la sustancia problema), obtenidas en los experimentos + Irr y - Irr realizados en paralelo,

— análisis de las curvas respuesta-concentración: si es posible, cálculo de la CI_{50} (+ Irr) y de la CI_{50} (- Irr),

— comparación de las dos curvas respuesta-concentración obtenidas con y sin irradiación, calculando bien el factor de fotoirritación (PIF) o bien el fotoefecto medio (MPE),

— criterios de aceptación del ensayo; control con el disolvente en paralelo:

— viabilidad absoluta (densidad óptica del extracto de rojo neutro) de las células irradiadas y no irradiadas,

— datos anteriores sobre controles negativos y de disolvente, medias y desviaciones típicas.

— criterios de aceptación del ensayo; control positivo en paralelo:

▼B

— CI_{50}(+ Irr) y CI_{50}(- Irr) y PIF/MPE de la sustancia del control positivo;

— datos anteriores sobre la sustancia del control positivo: CI_{50}(+ Irr) y CI_{50}(- Irr) y PIF/MPE, medias y desviaciones típicas.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, *22,* 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24,119-124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

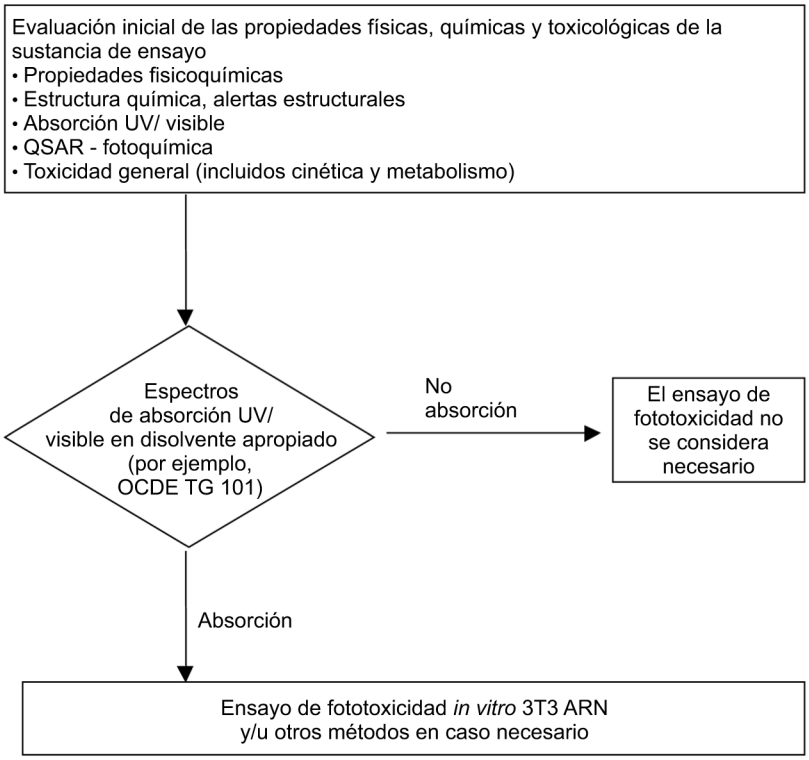
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_ 2649 34377 2349687 _1_1_1_1, 00.html

▼B

ANEXO 1

Función del ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN en un enfoque secuencial de los ensayos de fototoxicidad de sustancias químicas

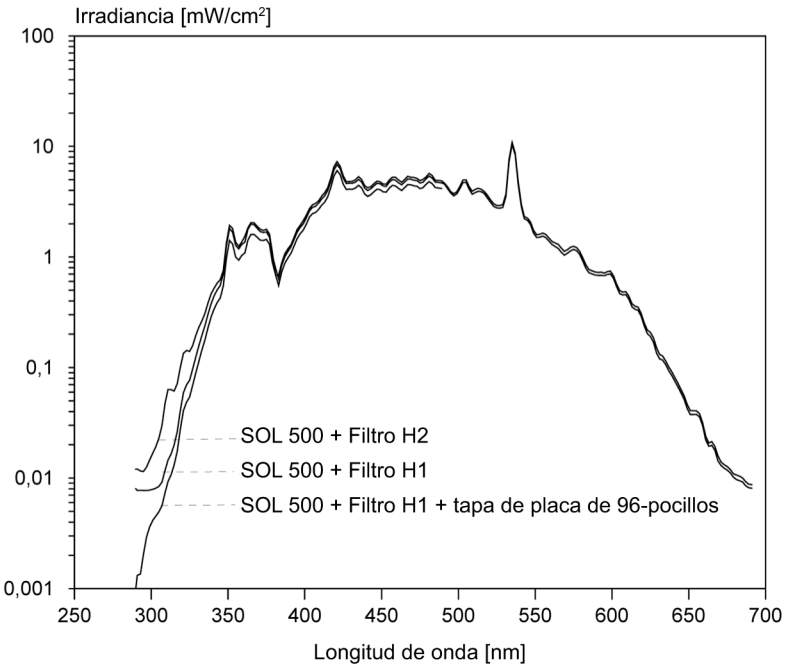


▼B

ANEXO 2

Figura 1

Distribución espectral de potencia de un simulador solar con filtro



(véase el punto 1.4.1.5, párrafo segundo)

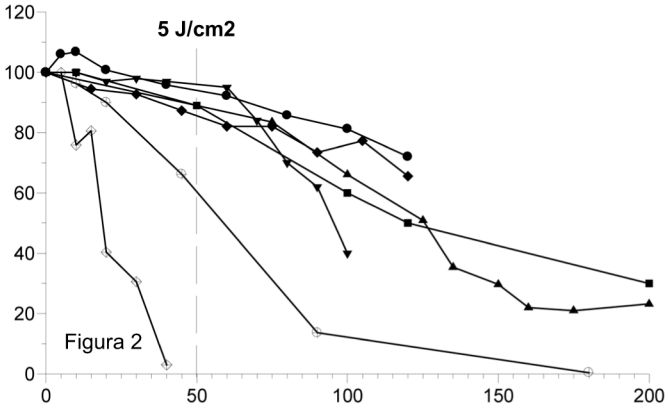
La figura 1 muestra un ejemplo de distribución aceptable de la irradiancia espectral de un simulador solar con filtro. Procede de la fuente de haluro metálico cebado utilizada en la prueba de validación del ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN (6) (8) (17). Se indica el efecto de dos filtros distintos y el efecto filtrante adicional de la tapa de una placa de cultivo celular de 96 pocillos. El filtro H2 solo se ha utilizado con sistemas de ensayo que pueden tolerar una cantidad elevada de UVB (ensayo con modelo de piel y ensayo de fotohemólisis de eritrocitos). En el ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN se utilizó el filtro H1. La figura muestra que el efecto filtrante adicional de la tapa de la placa se observa sobre todo en la banda de UVB, pero queda en el espectro de irradiación una cantidad suficiente de UVB para excitar sustancias que absorben normalmente en esta banda, como la amiodarona (véase el cuadro 1).

▼B

Figura 2

Sensibilidad de las células Balb/c 3T3 ante la irradiación (medida en la banda UVA)

Viabilidad de las células (porcentaje de la absorción de rojo neutro respecto a los controles mantenidos en la oscuridad)



(Véanse el punto 1.4.1.5.2, párrafo segundo, y los puntos 1.4.2.2.1 y 1.4.2.2.2)

Sensibilidad de las células Balb/c 3T3 ante la irradiación con el simulador solar utilizado en la prueba de validación del ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN, medida en la banda UVA. La figura muestra los resultados obtenidos en siete laboratorios diferentes en el estudio de prevalidación (1). Las dos curvas con símbolos huecos se obtuvieron con células viejas (gran número de pases), que tuvieron que sustituirse por nuevas poblaciones celulares, mientras que las curvas con símbolos macizos corresponden a células con una tolerancia aceptable a la irradiación.

Con estos datos se determinó que la dosis máxima de irradiación no citotóxica es de 5 J/cm^2 (línea discontinua vertical). La línea discontinua horizontal muestra además el efecto aceptable máximo de irradiación contemplado en el punto 1.4.2.2.

▼M3

B.42. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE basados en ellas se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Ya se ha adoptado el método de ensayo (ME) original para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA, así como una revisión de los trabajos asociados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). El LLNA actualizado se basa en la evaluación de la experiencia y de los datos científicos (12). Este es el segundo ME que se diseña para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. El otro ME (es decir, el correspondiente a la TG 406 de la OCDE, capítulo B.6 del presente anexo) utiliza ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (13). El LLNA resulta más ventajoso que el método B.6 y la TG 406 de la OCDE (13) en cuanto al bienestar de los animales. El presente ME LLNA actualizado incluye un conjunto de normas de comportamiento (NC) (apéndice 1) que puede utilizarse para evaluar la situación de la validación de métodos de ensayo nuevos o modificados que sean similares, desde el punto de vista funcional y mecánico, al LLNA, de acuerdo con los principios del documento de orientación nº 34 de la OCDE (14).

2. El LLNA estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Ha de señalarse que los sensibilizantes suaves o moderados que se recomiendan como productos químicos adecuados para el control positivo (CP) en métodos de ensayo con cobayas (es decir, el B.6, TG 406 de la OCDE) (13), son también apropiados para utilizarse en el LLNA (6) (8) (15). En este ME se describe también la opción de un LLNA reducido (rLLNA), que podría suponer una reducción de hasta el 40 % del número de animales utilizados (16) (17) (18). El rLLNA puede utilizarse cuando sea necesario a efectos normativos confirmar una predicción negativa de potencial de sensibilización cutánea, siempre que se respeten todas las demás especificaciones del protocolo del LLNA, como se describe en el presente ME. La predicción de un resultado negativo debe efectuarse sobre la base de toda la información disponible según se describe en el punto 4. Antes de aplicar el rLLNA, debe aportarse una justificación clara y científicamente motivada de su uso. Si, contra lo esperado, se obtiene un resultado positivo o dudoso en el rLLNA, puede ser necesario efectuar más ensayos para interpretar o aclarar la observación. El rLLNA no debe utilizarse para identificar el peligro de sustancias problema que sean sensibilizantes cutáneos cuando se necesite información sobre la relación dosis-respuesta, tal como la subcategorización a efectos del Reglamento (CE) nº 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y del Sistema Globalmente Armonizado de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos.

DEFINICIONES

3. En el apéndice 2 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA constituye un método alternativo para identificar productos químicos que pueden ser sensibilizantes cutáneos. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA en lugar de los ensayos con cobayas (es decir, el B.6, TG 406 de la OCDE) (13), sino que, como su valor es equivalente, el LLNA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior. Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre

▼M3

la sustancia problema. Tal información ha de incluir la identidad y la estructura química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA es apropiado para cada sustancia problema (dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA; véase el punto 5) y de ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA es un método *in vivo*, por lo que no elimina el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. No obstante, puede reducir el número de animales necesarios para este fin. Además supone un refinamiento sustancial (menos dolor y molestias) de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto. El LLNA se basa en la consideración de fenómenos inmunológicos desencadenados por sustancias químicas durante la fase de inducción de la sensibilización. Al contrario que los ensayos que utilizan cobayas (es decir, los del capítulo B.6, TG 406 de la OCDE) (13), el LLNA no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Tampoco exige el uso de coadyuvantes, como ocurre en el ensayo de maximización con cobayas (13). Por consiguiente, el LLNA reduce el dolor y las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone con respecto al ensayo del capítulo B.6 y a la TG 406 de la OCDE, ha de reconocerse que hay ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar el capítulo B.6 o la TG 406 de la OCDE (13) (por ejemplo, los resultados falsos negativos que se producen en el LLNA con determinados metales, los falsos positivos con algunos irritantes cutáneos (como algunos productos químicos del tipo de los agentes tensioactivos) (19) (20), o la solubilidad de la sustancia problema). Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (21) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el B.6 o la TG 406 de la OCDE) (13). Por otra parte, según la limitada base de datos de la validación, que se refiere principalmente a formulaciones de plaguicidas, el LLNA tiene mayor probabilidad que el ensayo con cobayas de dar un resultado positivo con estos tipos de sustancias problema (22). Sin embargo, cuando se somete a ensayo una formulación, podría considerarse la inclusión de sustancias similares con resultados conocidos como sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el LLNA funciona correctamente (véase el punto 16). Dejando aparte estas limitaciones detectadas, el LLNA debería ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que haya propiedades asociadas a esta que puedan interferir con la exactitud del LLNA.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. El principio básico del LLNA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia problema. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 3 para que se pueda justificar la clasificación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos aquí descritos se basan en el uso de marcado radiactivo *in vivo* para medir el aumento del número de células en proliferación presentes en los ganglios linfáticos auriculares que drenan la zona. Sin embargo, pueden emplearse otros parámetros para evaluar el número de células en proliferación, siempre que se cumplan plenamente los requisitos de las normas de comportamiento (apéndice 1).

▼M3

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Se utilizan hembras adultas jóvenes de las cepas CBA/Ca o CBA/J, nulíparas y que no estén preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que no existen diferencias significativas específicas de la cepa o del sexo en la respuesta del LLNA.

Alojamiento y alimentación

8. Los ratones deben alojarse en grupos (23), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Preparación de los animales

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

Preparación de las soluciones administradas

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

Verificación de la fiabilidad

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar una respuesta positiva en el LLNA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del índice de estimulación > 3 con

▼M3

respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del CP debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un índice de estimulación > 20 sería excesivo). Los controles positivos preferidos son aldehído hexilcinámico (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v) y mercaptobenzotiazol (nº CAS 149-30-4) al 5 % en *N,N*-dimetilformamida (véase el apéndice 1, cuadro 1). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos ≤ 6 meses) del CP en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de controles positivos históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA mediante la obtención constante de resultados positivos con los controles positivos en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados sobre los controles positivos.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin CP en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con CP. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con CP periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con las sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con CP periódico aceptable y el estudio con CP periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un CP en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de CP en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (12).

15. Aunque el CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (24). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias problema de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser también útil emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias problema. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

▼M3

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de animales y niveles de dosis

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y del vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (3) y (5). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (3) (25). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (19), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias problema hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de la sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 35). Además, cuando se obtienen datos de cada uno de los animales, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP (12). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. Sin embargo, algunas autoridades normativas pueden considerar aceptables los datos de conjuntos de animales; en tales situaciones, los usuarios pueden elegir entre recoger datos de cada animal o de conjuntos de animales.

Ensayo de cribado previo

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

▼M3

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 6). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (25). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), y el día 6. Además, el día 6 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación cutánea local viene indicada por una puntuación de eritema ≥ 3 o por un aumento del espesor de la oreja ≥ 25 % cualquiera de los días de la medición (26) (27). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18), induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

Cuadro 1

Puntuación del eritema

Observación	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema	4

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (26) (27), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 %, estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (30) (32) (33) (34).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (35) (36) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 6, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva (37).

▼M3

Calendario experimental del estudio principal

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. En el dorso de cada oreja se aplican 25 µl de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2 y 3:* Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.

— *Días 4 y 5:* Sin tratamiento.

— *Día 6:* Se toma nota del peso de cada animal. Se inyectan 250 µl de solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) estéril que contenga 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de ^{3}H-metil-timidina (tritiada) a todos los ratones (de evaluación y de control) a través de la vena de la cola. Otra posibilidad es inyectar 250 µL de PBS estéril con 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-yododesoxiuridina y fluorodesoxiuridina 10^{-5} M a todos los ratones por la vena de la cola. Al cabo de cinco horas (5 h), se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se sumergen en PBS, poniendo juntos los de cada animal (enfoque por animales individuales); la otra posibilidad consiste en extirpar los ganglios linfáticos de cada oreja y sumergirlos en PBS, poniendo juntos los procedentes de cada grupo de tratamiento (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento). En la referencia (12) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

Preparación de las suspensiones celulares

26. Se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos (CGL) extraídos bilateralmente siguiendo el enfoque por animales individuales o, alternativamente, el de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, mediante disgregación mecánica suave a través de una malla de acero inoxidable de 200 µm de luz, u otra técnica aceptable que permita obtener una suspensión de células sueltas. Las suspensiones de CGL se lavan dos veces con un exceso de PBS y el ADN se precipita con ácido tricloroacético (ATC) al 5 %, a 4 °C durante 18 h (3). A continuación el sedimento se vuelve a suspender en 1 mL de ATC y se traslada a viales de centelleo con 10 mL de líquido de centelleo para el recuento de ^{3}H, o se transfiere directamente a tubos de recuento γ para el recuento de ^{125}I.

Determinación de la proliferación celular (radiactividad incorporada)

27. La incorporación de ^{3}H-metil-timidina se mide con el contador de centelleo β, que cuenta las desintegraciones por minuto (DPM). La incorporación de ^{125}I-yododesoxiuridina se mide por el recuento de ^{125}I y también se expresa en DPM. Dependiendo del enfoque utilizado, la incorporación se expresará como DPM/ratón (enfoque por animales individuales) o DPM/grupo de tratamiento (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento).

LLNA reducido

28. En ciertas situaciones, cuando sea necesario a efectos normativos confirmar una predicción negativa de potencial de sensibilización cutánea, es posible utilizar un protocolo de LLNA reducido (rLLNA) (16) (17) (18) con menos animales, siempre que se respeten todas las demás especificaciones del protocolo del LLNA, como se describe en el presente ME. Antes de aplicar el rLLNA, debe aportarse una justificación clara y científicamente motivada de su uso. Si se obtiene un resultado positivo o dudoso en el rLLNA, puede ser necesario efectuar más ensayos para interpretar o aclarar la observación.

▼M3

29. La reducción del número de grupos de dosis es la única diferencia entre los protocolos del LLNA y del rLLNA, por lo que este rLLNA no proporciona información sobre la relación dosis-respuesta. En consecuencia, no debe utilizarse el rLLNA cuando se necesite obtener información sobre dicha relación. Como en el LLNA de dosis múltiples, la máxima concentración de la sustancia problema evaluada en el rLLNA debe ser la concentración máxima que no induzca en el ratón toxicidad sistémica manifiesta ni excesiva irritación cutánea local (véase el punto 18).

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

30. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (37).

Pesos corporales

31. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

32. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE. Si se emplea el enfoque por animales individuales, el IE se obtiene dividiendo la media de los valores de DPM de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema, y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores de DPM de los ratones del grupo de control del vehículo (CV) o disolvente. El IE medio del CV es entonces la unidad. Si se emplea el enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, el IE se obtiene dividiendo la incorporación de radiactividad del conjunto de cada grupo de tratamiento por la incorporación de radiactividad del conjunto del grupo de CV; así se obtiene un IE medio.

33. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es $\geq$ 3. Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos de disolvente o vehículo y de CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso se declara positivo (4) (5) (6).

34. Si fuera necesario aclarar los resultados obtenidos, se tendrán en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea local en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (7).

35. La recogida de datos de radiactividad de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos en cuanto a la presencia y el grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos de CV paralelos). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados «valores atípicos»).

▼M3

DATOS E INFORME

Datos

36. Se resumirán los datos en forma de cuadro. Si se emplea el enfoque por animales individuales, deben indicarse los valores de DPM de cada animal, la media de DPM/animal del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo de CV en paralelo. Si se emplea el enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, ha de indicarse la media o la mediana del valor de DPM, y la media del IE de cada grupo de tratamiento, comparado con el grupo de CV en paralelo.

Informe del ensayo

37. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote],

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

▼M3

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— un cuadro con los valores de DPM y del IE de cada ratón (enfoque por animales individuales) o medios (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento), correspondientes a cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores de DPM/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento, cuando se utilice el enfoque por animales individuales,

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos tratados con la sustancia problema como en los de control, cuando se utilice el enfoque por animales individuales,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OCDE (1992), *Skin Sensitisation.* OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) Comité Científico Consultivo del CEVMA (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), Comisión Europea, Dirección General Centro Común de Investigación, Instituto de Sanidad y Protección de los Consumidores, Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, april 2007. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OCDE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Disponible en la dirección: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radiactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) OCDE (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Apéndice 1

Normas de comportamiento para la evaluación de métodos de ensayo LLNA similares o modificados que se propongan para determinar la sensibilización cutánea

INTRODUCCIÓN

1. El objetivo de las normas de comportamiento (NC) consiste en comunicar la base por la que puede determinarse si un nuevo método de ensayo, tanto protegido (es decir, sujeto a derechos de autor, patentado, registrado) como no protegido, presenta la suficiente exactitud y fiabilidad para determinados fines de ensayo. Estas normas de comportamiento, basadas en métodos de ensayo validados y aceptados, pueden utilizarse para evaluar la fiabilidad y la exactitud de otros métodos similares (conocidos como ensayos «de imitación») que se basan en principios científicos similares y miden o predicen el mismo efecto biológico o tóxico (14).

2. Antes de la adopción de métodos modificados (es decir, posibles mejoras propuestas para un método de ensayo aprobado), debe efectuarse una evaluación para determinar el efecto que tienen los cambios propuestos sobre el comportamiento del ensayo y el grado en que tales cambios afectan a la información disponible para los demás componentes del proceso de validación. En función del número y de la naturaleza de los cambios propuestos, de los datos generados y de la documentación justificativa de tales cambios, estos métodos deben someterse o bien al mismo proceso de validación descrito para un nuevo ensayo o bien, si procede, a una evaluación limitada de la fiabilidad y de la pertinencia utilizando normas de comportamiento establecidas (14).

3. Los métodos similares o modificados cuyo uso se proponga con arreglo al presente método de ensayo deben evaluarse para determinar su fiabilidad y exactitud utilizando sustancias representativas de toda la gama de resultados del LLNA. Para evitar el uso injustificado de animales, se recomienda insistentemente que los diseñadores de modelos consulten con las autoridades competentes antes de iniciar los estudios de validación de acuerdo con las normas de comportamiento y las orientaciones recogidas en el presente método de ensayo.

4. Estas normas de comportamiento se basan en las normas de comportamiento armonizadas del ICCVAM de EE. UU., del CEVMA de la Comisión Europea y del CVAM de Japón (12), para evaluar la validez de versiones similares o modificadas del LLNA. Las normas de comportamiento consisten en componentes fundamentales del método de ensayo, sustancias de referencia recomendadas y niveles de exactitud y fiabilidad que el método propuesto debe cumplir o superar.

I. **Componentes fundamentales del método de ensayo**

5. Para garantizar que un método de LLNA similar o modificado es análogo, desde el punto de vista funcional y mecánico, al LLNA y mide el mismo efecto biológico, deben incluirse en el protocolo del método de ensayo los siguientes componentes:

— la sustancia problema debe aplicarse tópicamente en ambas orejas del ratón,

— la proliferación de linfocitos debe medirse en los ganglios linfáticos que drenan la zona donde se aplica la sustancia problema,

— la proliferación de linfocitos debe medirse durante la fase de inducción de la sensibilización cutánea,

▼M3

— respecto a las sustancias problema, la dosis más alta seleccionada debe ser la concentración máxima que no induzca toxicidad sistémica ni excesiva irritación cutánea local en el ratón. Respecto a las sustancias de referencia positivas, la dosis más alta debe ser al menos tan elevada como los valores de CE3 de las correspondientes sustancias de referencia del LLNA (véase el cuadro 1) sin producir toxicidad sistémica ni excesiva irritación cutánea local en el ratón,

— en cada estudio debe incluirse un CV en paralelo y, cuando sea pertinente, también un CP en paralelo,

— debe utilizarse un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis,

— pueden recogerse datos de cada animal o bien de conjuntos de animales.

Si no se cumple alguno de estos criterios, no pueden utilizarse estas normas de comportamiento para la validación del método similar o modificado.

II. **Lista mínima de sustancias de referencia**

6. Las normas de comportamiento armonizadas del ICCVAM de EE. UU., del CEVMA de la Comisión Europea y del CVAM de Japón (12) señalan 18 sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse y otras cuatro optativas [es decir, sustancias que producen resultados falsos positivos o falsos negativos en el LLNA, cuando se comparan con los resultados obtenidos con seres humanos y cobayas (el B.6, o la TG 406 de la OCDE) (13), por lo que brindan la oportunidad de demostrar un comportamiento igual o mejor que el del LLNA] que están incluidas en las normas de comportamiento del LLNA. Los criterios de selección para escoger estas sustancias son los siguientes:

— la lista de sustancias de referencia representa los tipos de sustancias que se someten normalmente a ensayo para determinar el potencial de sensibilización cutánea y la gama de respuestas que el LLNA es capaz de medir o predecir,

— las sustancias tienen una estructura química bien definida,

— respecto a cada sustancia se dispone de datos de apoyo para el LLNA procedentes de ensayos con cobayas (es decir, el capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE) (13) y, en la medida de lo posible, de datos obtenidos con seres humanos,

— las sustancias pueden conseguirse fácilmente a través de un proveedor comercial.

En el cuadro 1 se recogen las sustancias de referencia recomendadas, que deben evaluarse en el vehículo con el que figuran en el cuadro 1. En caso de que no se disponga de una sustancia de la lista, pueden utilizarse otras sustancias que cumplan los criterios de selección mencionados, aportando la justificación correspondiente.

▼M3

Cuadro 1

Sustancias de referencia recomendadas para las normas de comportamiento del LLNA

Número	Sustancias ([1])	Nº CAS	Forma	Veh. ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5 x – 2,0 x CE3	Rango real CE3	LLNA/ cobayas	LLNA/seres humanos
1	5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMI) y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Líq.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sól.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiamina	106-50-3	Sól.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloruro de cobalto	7646-79-9	Sól.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Líq.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sól.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Líq.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	AHC	101-86-0	Líq.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Líq.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoato de fenilo	93-99-2	Sól.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alcohol cinámico	104-54-1	Sól.	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Sól.	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilato de metilo	80-62-6	Líq.	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenceno	108-90-7	Líq.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Líq.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Número	Sustancias (1)	Nº CAS	Forma	Veh. (2)	CE3 % (3)	N (4)	0,5 x – 2,0 x CE3	Rango real CE3	LLNA/ cobayas	LLNA/seres humanos
16	Ácido láctico	50-21-5	Líq.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato de metilo	119-36-8	Líq.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Ácido salicílico	69-72-7	Sól.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Sustancias optativas para demostrar un comportamiento mejorado respecto al LLNA										
19	Laurilsulfato de sodio	151-21-3	Sól.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetacrilato de etilenglicol	97-90-5	Líq.	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xileno	1330-20-7	Líq.	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloruro de níquel	7718-54-9	Sól.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abreviaturas: AOO = Acetona: aceite de oliva (4:1, v/v); nº CAS = número del Chemical Abstracts Service; DMF = *N,N*-dimetilformamida; DMSO = dimetilsulfóxido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenceno; CE3 = concentración estimada que se considera necesaria para producir un índice de estimulación de 3; cobayas = resultado del ensayo con cobayas (es decir, el B. 6 o TG 406 de la OCDE) (13); AHC = aldehído hexilcinámico; Líq. = líquido; LLNA = resultado del ensayo con ganglios linfáticos locales de múrido (es decir, el B. 42 o TG 429 de la OCDE) (1); MEK = metil-etil-cetona; NA = no aplicable por ser el índice de estimulación < 3; NC = no calculado al haberse obtenido los datos de un solo estudio; Sól. = sólido; Veh. = vehículo del ensayo.

(*) Se supone que no es sensibilizante en seres humanos, ya que no se han encontrado resultados clínicos de la prueba del parche, no está incluido en el juego de alérgenos de la prueba del parche y tampoco se han encontrado informes de casos de sensibilización en seres humanos.

(**) No se dispone de datos de ensayos con cobayas.

(1) Las sustancias deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

(2) Debido al posible efecto del uso de vehículos diferentes sobre el comportamiento del LLNA, debe utilizarse el vehículo recomendado para cada sustancia de referencia (24) (32).

(3) El valor medio si se dispone de más de un valor de CE3. En caso de sustancias negativas (es decir, con un índice de estimulación < 3), se proporcionará la concentración de ensayo más elevada.

(4) Número de estudios de LLNA de los que se han obtenido datos.

(5) Disponible comercialmente como Kathon CG (nº CAS 55965-84-9), que es una mezcla 3:1 de CMI y MI. Las concentraciones relativas de cada componente varían del 1,1 % al 1,25 % (CMI) y del 0,3 % al 0,45 % (MI). Los componentes inactivos son sales de magnesio (del 21,5 % al 24 %) y nitrato de cobre (del 0,15 % al 0,17 %), y el resto de la formulación consiste en agua, entre el 74 % y el 77 %. Puede adquirirse fácilmente Kathon CG a través de Sigma-Aldrich y Rohm and Haas (actualmente, Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Niveles definidos de fiabilidad y exactitud**

7. La exactitud de un método de LLNA similar o modificado debe ser al menos igual a la de las normas de comportamiento del LLNA cuando se evalúa con las 18 sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse. El método nuevo o modificado debe llevar a una clasificación correcta basada en una decisión de tipo «sí/no». Sin embargo, es posible que el método nuevo o modificado no clasifique correctamente todas las sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse. Si, por ejemplo, queda mal clasificado uno de los sensibilizantes débiles, podría tenerse en cuenta, a efectos de demostración de la equivalencia de comportamiento, una justificación de la clasificación errónea y la aportación de datos adicionales (por ejemplo, resultados del ensayo que proporcionen clasificaciones correctas de otras sustancias con propiedades físicas, químicas y sensibilizantes similares a las de la sustancia de referencia mal clasificada). En tales circunstancias, la situación de la validación del método de ensayo LLNA nuevo o modificado podría evaluarse caso por caso.

Reproducibilidad intralaboratorios

8. Para determinar la reproducibilidad intralaboratorios de un método de LLNA nuevo o modificado, hay que utilizar una sustancia sensibilizante que esté bien caracterizada en el LLNA. Por tanto, las normas de comportamiento del LLNA se basan en la variabilidad de los resultados obtenidos con el aldehído hexilcinámico (AHC) en ensayos repetidos. Para evaluar la fiabilidad intralaboratorios, deben obtenerse valores de concentración estimada umbral (CEu) del AHC en cuatro ocasiones distintas, con un intervalo de al menos una semana entre los ensayos. Una reproducibilidad intralaboratorios aceptable viene indicada por la capacidad del laboratorio de obtener, en cada ensayo con AHC, unos valores de CEu entre el 5 % y el 20 %, que representan un rango de 0,5-2,0 veces el valor medio de CE3 especificado para el AHC (10 %) en el LLNA (véase el cuadro 1).

Reproducibilidad interlaboratorios

9. Para determinar la reproducibilidad interlaboratorios de un método de LLNA nuevo o modificado, hay que utilizar dos sustancias sensibilizantes que estén bien caracterizadas en el LLNA. Las normas de comportamiento del LLNA se basan en la variabilidad de los resultados obtenidos con el AHC y el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) en ensayos realizados en diferentes laboratorios. Los valores de CEu deben obtenerse independientemente a partir de un solo estudio llevado a cabo en al menos tres laboratorios distintos. Para demostrar que la reproducibilidad interlaboratorios es aceptable, cada laboratorio debe obtener unos valores de CEu del 5 % al 20 % con el AHC y del 0,025 % al 0,1 % con el DNCB, que representan un rango de 0,5-2,0 veces el valor medio de CE3 especificado para el AHC (10 %) y el DNCB (0,05 %), respectivamente, en el LLNA (véase el cuadro 1).

▼M3

Apéndice 2

Definiciones

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (14).

Sustancia de evaluación comparativa: Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características fisicoquímicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

Concentración estimada umbral (CEu): Concentración estimada de una sustancia problema que se necesita para conseguir un índice de estimulación indicativo de una respuesta positiva.

Concentración estimada tres (CE3): Concentración estimada de una sustancia problema que se necesita para conseguir un índice de estimulación de tres.

Falso negativo: Sustancia problema identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa.

Falso positivo: Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva o activa por un método de ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva.

Peligro: Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias problema, pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (14).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (14).

Ensayo de imitación: Denominación de un método de ensayo que es estructural y funcionalmente similar a un método de ensayo de referencia, validado y aceptado. Tales métodos de ensayo serían candidatos para una validación de actualización. También se pueden denominar métodos de ensayo similares (14).

Valor atípico: Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

Normas de comportamiento: Normas, basadas en un método de ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto, que es similar desde el punto de vista funcional y mecánico. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo, ii) una lista mínima de sustancias de referencia seleccionadas de entre las sustancias utilizadas para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado, y iii) los niveles similares de exactitud y fiabilidad que, sobre la base de lo obtenido con el método de ensayo validado, debe mostrar el método de ensayo propuesto cuando se evalúa con la lista mínima de sustancias de referencia (14).

Método de ensayo protegido: Método de ensayo cuyos elementos tienen la fabricación y distribución restringida por patentes, derechos de autor, marcas registradas, etc.

▼**M3**

Garantía de calidad: Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

Sustancias de referencia: Sustancias seleccionadas para utilizarse en el proceso de validación, cuyas respuestas en el sistema de ensayo de referencia *in vitro* o *in vivo* o en la especie de interés ya se conocen. Estas sustancias deben ser representativas de las clases de sustancias con las que esté previsto utilizar el método de ensayo, y deben representar toda la gama de respuestas que puede esperarse de las sustancias con las que pueda utilizarse, desde fuertes hasta débiles e incluso negativas. Es posible que se necesiten distintos conjuntos de sustancias de referencia para las diferentes fases del proceso de validación y para los distintos métodos de ensayo y usos de los ensayos (14).

Pertinencia: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (14).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (14).

Sensibilización cutánea: Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

Índice de estimulación (IE): Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

Método de ensayo validado: Método de ensayo sobre el cual se han completado los estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con respecto a un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (14).

▼B

B.43. **ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD EN ROEDORES**

1. **MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 424 (1997).

Este método de ensayo tiene por objeto obtener la información necesaria para confirmar o caracterizar de manera más precisa la posible neurotoxicidad de sustancias químicas en animales adultos. Puede combinarse con los actuales métodos de ensayo de los estudios de toxicidad por administración continuada o bien realizarse como estudio independiente. Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre estrategias y métodos de ensayo de neurotoxicidad (1) *(OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods),* que puede servir de ayuda para la concepción de estudios basados en este método de ensayo. Esta consulta es especialmente importante cuando se recomienden modificaciones de las observaciones y procedimientos de ensayo para el uso habitual del presente método. El documento orientativo se ha preparado a fin de facilitar la selección de otros procedimientos de ensayo que puedan emplearse en determinadas circunstancias.

En el presente método no se trata la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo.

1.1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de las características tóxicas de las sustancias químicas, es importante considerar el potencial de efectos neurotóxicos. El método de ensayo de toxicidad sistémica por administración continuada incluye ya observaciones para detectar la posible neurotoxicidad. El presente método de ensayo puede utilizarse para preparar un estudio destinado a obtener más información sobre los efectos neurotóxicos observados en los estudios de toxicidad sistémica por administración continuada o para confirmar tales efectos. Sin embargo, según la valoración que se haga de la posible neurotoxicidad de ciertas clases de sustancia químicas puede considerarse más conveniente evaluarlas mediante este método sin indicación previa de la posible neurotoxicidad a partir de estudios de toxicidad sistémica por administración continuada. Entre los aspectos que deben tenerse en cuenta para ello pueden citarse los siguientes:

— observación de signos neurológicos o lesiones neuropatológicas en estudios de toxicidad distintos de los estudios de toxicidad sistémica por administración continuada, o

— relación estructural u otro tipo de información que los relacione con neurotóxicos conocidos.

Además puede haber otros casos en los que sea adecuado utilizar este método de ensayo, para más información véase (1).

El presente método se ha concebido de manera que pueda ajustarse a distintas necesidades concretas a la hora de confirmar la neurotoxicidad histopatológica y comportamental de una sustancia, y de aportar una caracterización y cuantificación de las respuestas neurotóxicas.

▼B

Anteriormente, la neurotoxicidad se equiparaba a la neuropatía que implicaba lesiones neuropatológicas o disfunciones neurológicas, como convulsiones, parálisis o temblores. Aunque la neuropatía es una manifestación importante de la neurotoxicidad, actualmente se sabe que hay muchos otros signos que indican toxicidad en el sistema nervioso (por ejemplo, pérdida de coordinación motora, deficiencias sensoriales y disfunciones del aprendizaje y la memoria) y que pueden no aparecer en estudios de neuropatía o en otros tipos de estudios.

El presente método de ensayo de neurotoxicidad está pensado para detectar efectos neuropatológicos y neurocomportamentales en roedores adultos. Aunque los efectos en el comportamiento, incluso en ausencia de cambios morfológicos, pueden dar cuenta de un impacto nocivo en el organismo, no todas las alteraciones del comportamiento están relacionadas con el sistema nervioso. Por lo tanto, cualquier cambio observado tiene que evaluarse junto con datos correlativos de tipo bioquímico, hematológico e histopatológico, y con datos sobre otros tipos de toxicidad sistémica. Las pruebas prescritas en este método para obtener la caracterización y cuantificación de las respuestas neurotóxicas incluyen procedimientos comportamentales e histopatológicos que pueden ir apoyados de manera complementaria por investigaciones bioquímicas y/o electrofisiológicas (1) (2) (3) (4).

Los neurotóxicos pueden actuar sobre un número de dianas dentro del sistema nervioso y mediante una gran variedad de mecanismos. Dado que no hay ningún conjunto de ensayos que, por sí solo, sea capaz de evaluar perfectamente el potencial neurotóxico de todas las sustancias, puede ser necesario utilizar otros ensayos *in vivo* o *in vitro* aplicables concretamente al tipo de neurotoxicidad observada o prevista.

Este método de ensayo puede aplicarse también junto con las orientaciones establecidas en el documento de la OCDE denominado *OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods* (1) a fin de preparar estudios destinados a caracterizar de manera más precisa la cuantificación dosis-respuesta o a aumentar la sensibilidad de esta, de manera que pueda estimarse más exactamente un nivel sin efectos adversos observados o comprobar peligros sospechados o conocidos de la sustancia. Por ejemplo, pueden prepararse estudios para determinar y evaluar los mecanismos neurotóxicos o para complementar los datos ya disponibles a partir de los procedimientos básicos de observación neuropatológica y neurocomportamental. No es necesario que estos estudios generen de nuevo datos que se obtendrían también a partir de los procedimientos estándar recomendados en el presente método, si estos datos ya son conocidos y no se consideran necesarios para la interpretación de los resultados del estudio.

Este estudio de neurotoxicidad, cuando se realiza solo o en combinación con otros, aporta información que puede:

— determinar si el sistema nervioso está afectado de manera permanente o reversible por la sustancia ensayada;

— contribuir a la caracterización de las alteraciones del sistema nervioso relacionadas con la exposición a la sustancia y a la comprensión de los mecanismos que intervienen;

▼B

— determinar las relaciones entre dosis y tiempo de respuesta a fin de estimar un nivel sin efectos adversos observados (que pueda utilizarse con objeto de establecer criterios de seguridad para la sustancia).

En este método de ensayo se administra la sustancia estudiada por vía oral. Otras vías de administración (por ejemplo, por vía dérmica o por inhalación) pueden resultar más adecuadas y requerir modificaciones de los procedimientos recomendados. La elección de la vía de administración depende del perfil de exposición humana y de la información cinética y toxicológica disponible.

1.2. DEFINICIONES

Efecto adverso: toda alteración respecto a una situación de referencia, relacionada con el tratamiento, que disminuya la capacidad del organismo para sobrevivir, reproducirse o adaptarse al entorno.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

Posología: término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

Neurotoxicidad: alteración adversa de la estructura o función del sistema nervioso debida a la exposición a un agente físico, biológico o químico.

Neurotóxico: cualquier agente físico, biológico o químico que pueda provocar neurotoxicidad.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra por vía oral una serie de dosis de la sustancia a varios grupos de roedores de laboratorio. Normalmente se requiere una administración continuada y el período de administración puede ser 28 días, 90 días (toxicidad subcrónica) o 1 año o más (toxicidad crónica). Los procedimientos establecidos en este método de ensayo pueden aplicarse también a un estudio de neurotoxicidad aguda. Los animales se someten a ensayo para detectar anomalías neurológicas o del comportamiento o para caracterizarlas. Durante cada período de observación se evalúa una gama de comportamientos que podría estar afectada por neurotóxicos. Al final del ensayo, se hace una perfusión *in situ* a un subgrupo de animales de cada sexo y de cada grupo, y se preparan y examinan secciones de los nervios periféricos y de la médula espinal y el cerebro.

Cuando se trate de un estudio único independiente destinado a detectar neurotoxicidad o a caracterizar los efectos neurotóxicos, los animales de cada grupo no empleados para perfusión y posterior histopatología (véase el cuadro 1) pueden utilizarse para otros procedimientos concretos de tipo electrofisiológico, neuroquímico, neuropatológico o neurocomportamental que puedan complementar los datos obtenidos a partir de los exámenes estándar prescritos en el presente método (1). Estos procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando las observaciones empíricas o los efectos previstos indiquen un tipo determinado o una diana de neurotoxicidad química. Otra posibilidad es utilizar los animales restantes para evaluaciones como las prescritas en los métodos de ensayo para estudios de toxicidad por administración continuada en roedores.

▼B

Cuando los procedimientos del presente método de ensayo se combinen con los de otros métodos, se necesita un número suficiente de animales para que puedan cumplirse todos los requisitos de las observaciones de ambos estudios.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete, preferiblemente, antes de que los animales tengan 6 semanas de edad y, en cualquier caso, antes de que tengan 9 semanas. No obstante, cuando este estudio se combine con otros, podrían tener que ajustarse estos requisitos de edad. Al principio del estudio, la diferencia de peso entre los animales empleados no debe superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando se realice un estudio de la toxicidad oral por administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

1.4.2. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ºC (± 3 ºC). Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Debe mantenerse al mínimo el ruido fuerte intermitente. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo.

1.4.3. **Preparación de los animales**

Se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en los lotes testigo y tratado. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Los animales se identifican individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

1.4.4. **Vía de administración y preparación de las dosis**

En este método de ensayo se administra la sustancia estudiada por vía oral. La administración de la sustancia por vía oral puede hacerse mediante una sonda, la dieta, el agua o cápsulas. Pueden usarse otras vías de administración (por ejemplo: cutánea o inhalación) pero en este caso pueden tener que modificarse los procedimientos recomendados. La elección de la vía de administración depende del perfil de exposición humana y de la información cinética y toxicológica disponible. Deberá justificarse adecuadamente la elección de la vía de administración, así como las consiguientes modificaciones de los procedimientos del método de ensayo.

▼B

En caso necesario, la sustancia estudiada se disolverá o suspenderá en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible solución o suspensión en otros vehículos. Las características tóxicas del vehículo deben ser conocidas. Además, deben valorarse las siguientes características del vehículo: efectos en la absorción, la distribución, el metabolismo o la retención de la sustancia estudiada que puedan alterar sus características tóxicas; y efectos en el consumo de alimentos y agua o en el estado nutricional de los animales.

1.5. PROCEDIMIENTOS

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

Cuando se trate de un estudio único independiente, se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) en cada grupo tratado y de control para la evaluación de las observaciones clínicas y funcionales, que deben ser detalladas. Como mínimo 5 machos y 5 hembras, seleccionados entre estos 10 machos y 10 hembras, deben ser perfundidos *in situ* y utilizados para hacer una histopatología detallada al final del estudio. En los casos en que solo se observe un número limitado de animales en un grupo determinado para detectar efectos neurotóxicos, se considerará la inclusión de estos animales entre los seleccionados para perfusión. Cuando el estudio se lleve a cabo en combinación con un estudio de toxicidad por administración continuada, deberá usarse un número adecuado de animales para que puedan alcanzarse los objetivos de ambos estudios. En el cuadro 1 se da el número mínimo de animales por grupo para varias combinaciones de estudios. Si van a sacrificarse animales durante el experimento o están previstos grupos para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de efectos tóxicos con posterioridad al tratamiento, o cuando se plantee la realización de observaciones complementarias, habrá de aumentarse el número de animales para asegurar que se dispone de los animales necesarios para observación e histopatología.

1.5.2. **Lote tratado y lote testigo**

Deben utilizarse, al menos, tres grupos para tratamiento y uno para control. No obstante, si, a partir de la evaluación de otros datos, no son previsibles efectos a una dosis continuada de 1 000 mg/kg de peso corporal, podrá realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio para ayudar a determinar la gama de dosis que debe emplearse. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia de ensayo, el lote testigo recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

1.5.3. **Control de fiabilidad**

El laboratorio que lleve a cabo el estudio debe presentar datos que demuestren su capacidad de realizarlo y la sensibilidad de los procedimientos que emplee. Tales datos han de acreditar su capacidad de detectar y cuantificar, en su caso, los cambios en los diferentes parámetros cuya observación se recomienda, como signos neurovegetativos, reactividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz. En la bibliografía (referencias 2 a 29) puede encontrarse información sobre sustancias que causan diferentes tipos de respuestas neurotóxicas y que pueden usarse para controles positivos. Pueden utilizarse datos de referencia anteriores si se mantienen los aspectos esenciales de los procedimientos experimentales. Se recomienda la actualización periódica de los datos de referencia anteriores. Deben obtenerse nuevos datos que demuestren que los procedimientos mantienen la sensibilidad requerida cuando el laboratorio haya modificado alguno de los aspectos esenciales del ensayo o los procedimientos.

▼B

1.5.4. **Selección de la dosis**

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la toxicidad previamente observada y los datos cinéticos y de toxicidad disponibles referentes a la sustancia de ensayo o productos afines. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos neurotóxicos o efectos tóxicos sistémicos evidentes. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar cualquier posible relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior. En principio, las dosis deben fijarse de manera que los efectos tóxicos primarios en el sistema nervioso puedan distinguirse de los relacionados con la toxicidad sistémica. Los intervalos del doble al triple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si se dispone de una estimación razonable sobre la exposición del hombre, esta deberá también tenerse en cuenta.

1.5.5 **Ensayo límite**

Si en un estudio con una dosis de, al menos, 1 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo el procedimiento descrito, no se produce ningún efecto neurotóxico observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con 3 dosis. Según el grado previsto de exposición humana, puede ser preciso administrar una dosis oral superior en el ensayo límite. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo las que determinan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse. Para la realización de un estudio de toxicidad oral aguda, la dosis de un ensayo límite debe ser, al menos, 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administración de las dosis**

Las dosis de sustancia se administran a los animales todos y cada uno de los días del período de 28; es necesario justificar la aplicación de una posología de solo 5 días por semana o un período de exposición más corto. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal; no obstante, en el caso de las soluciones acuosas puede considerarse la posibilidad de administrar 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe precisarse el método escogido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en relación con el peso corporal del animal. Cuando se utilice un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar. Para estudios de toxicidad aguda, si no es posible utilizar una dosis única, podrá administrarse la sustancia en fracciones menores a lo largo de un período que no excederá de 24 horas.

▼B

1.6. OBSERVACIONES

1.6.1. **Frecuencia de las observaciones y ensayos**

En los estudios de administración continuada, el período de observación debe cubrir todo el período de administración. En los estudios de toxicidad aguda, debe haber un período de observación de 14 días posterior al tratamiento. En el caso de los animales de grupos satélite que se mantengan sin exposición durante el período posterior al tratamiento, las observaciones deben cubrir también este período.

Las observaciones deben hacerse con la frecuencia suficiente para que sea máxima la probabilidad de detección de cualquier anomalía neurológica o del comportamiento. Las observaciones deben hacerse preferiblemente a las mismas horas cada día prestando atención al período más agudo de los efectos previstos tras la administración. En el cuadro 2 se resume la frecuencia de las observaciones clínicas y las pruebas funcionales. Si, a partir de estudios anteriores, se dispone de datos cinéticos o de otro tipo que muestren la necesidad de utilizar tiempos diferentes para las observaciones, pruebas o períodos post-observación, se aplicará otro programa a fin de conseguir el máximo de información. Los cambios en el programa habrán de justificarse debidamente.

1.6.1.1. *Observaciones del estado general de salud y de la mortalidad/morbilidad*

Deberán observarse cuidadosamente todos los animales al menos una vez al día para comprobar su estado de salud y al menos dos veces al día para comprobar la mortalidad y la morbilidad.

1.6.1.2. *Observaciones clínicas detalladas*

Se someterán a observación clínica detallada todos los animales seleccionados con este fin (véase el cuadro 1) una vez antes de la primera exposición (para poder hacer comparaciones con un mismo sujeto) y después a diferentes intervalos según la duración del estudio (véase el cuadro 2). Deberán hacerse observaciones clínicas detalladas sobre lotes satélite de recuperación al final del período de recuperación. Las observaciones clínicas detalladas se harán fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y se registrarán cuidadosamente utilizando sistemas de puntuación que incluyan criterios o escalas de puntuación para cada medición de las observaciones. Los criterios o escalas deberán ser definidos explícitamente por el laboratorio que lleve a cabo el ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas (no relacionadas sistemáticamente con el tratamiento) y que las observaciones sean realizadas por observadores especializados ajenos al tratamiento.

Se recomienda que las observaciones se hagan de manera estructurada aplicando sistemáticamente criterios bien definidos (incluida la definición del «intervalo» normal) a cada animal en cada momento de observación. El «intervalo normal» deberá documentarse adecuadamente. Se registrarán todos los signos observados. Siempre que sea factible, se registrará también la magnitud de los signos observados. Las observaciones clínicas deben incluir, entre otras cosas, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, así como respiración por la boca, cualquier signo de orina o defecación y orina descolorida).

▼B

También habrá de anotarse cualquier respuesta no habitual en lo que se refiere a la posición del cuerpo, el nivel de actividad (por ejemplo, aumento o disminución de la exploración del ambiente normal en el que se mueva) y la coordinación de los movimientos. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha (por ejemplo, contoneo o ataxia), postura (por ejemplo, espalda encorvada) y respuesta a la manipulación, la colocación u otros estímulos ambientales, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, convulsiones o temblores, estereotipos (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, movimientos anómalos de la cabeza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, lamido excesivo o mordiscos, automutilación, marcha hacia atrás y vocalización) o agresión.

1.6.1.3. *Pruebas funcionales*

De manera semejante a las observaciones clínicas detalladas, deben efectuarse también pruebas funcionales una vez antes de la exposición y frecuentemente a continuación en todos los animales seleccionados con este fin (véase el cuadro 1). La frecuencia de estas pruebas depende también de la duración del estudio (véase el cuadro 2). Además de los períodos de observación establecidos en el cuadro 2, se llevarán a cabo observaciones funcionales de lotes satélite de recuperación lo más cercanas que sea posible al sacrificio final. Las pruebas funcionales deben incluir la reactividad sensorial frente a estímulos de diferentes tipos [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (5) (6) (7)], y la evaluación de la fuerza de prensión (8) y de la actividad motriz (9). La actividad motriz se medirá con un dispositivo automático capaz de detectar tanto aumentos como disminuciones de actividad. Si se usa otro sistema definido, este deberá ser cuantitativo y su sensibilidad y fiabilidad deberán demostrarse. Se probará cada dispositivo para asegurar la fiabilidad a lo largo del tiempo y la concordancia entre diferentes dispositivos. En las referencias respectivas se da más información sobre los procedimientos que pueden seguirse. Si no hay datos (por ejemplo, relaciones estructura-actividad, datos epidemiológicos, otros estudios toxicológicos...) que indiquen los posibles efectos neurotóxicos, debe considerarse la inclusión de pruebas más especializadas de funciones sensoriales o motrices o del aprendizaje y la memoria, para estudiar estos posibles efectos más detalladamente. En (1) se da más información sobre pruebas más especializadas y su aplicación.

Excepcionalmente, puede omitirse la prueba a animales que muestren signos de toxicidad en un grado tal que interfiera de manera significativa la prueba funcional. La eliminación de animales de cualquier prueba funcional se justificará debidamente.

1.6.2. **Peso corporal y consumo de alimento y agua**

Para estudios de hasta 90 días de duración, tienen que pesarse todos los animales al menos una vez por semana y deben hacerse mediciones del consumo de alimentos (consumo de agua, cuando la sustancia estudiada se administre por este medio) al menos semanalmente. Para estudios a largo plazo, deben pesarse todos los animales al menos una vez por semana durante las primeras 13 semanas y al menos una vez cada 4 semanas a continuación. Se medirá el consumo de alimentos (consumo de agua, cuando la sustancia estudiada se administre por este medio) al menos semanalmente durante las primeras 13 semanas y luego a intervalos de unos 3 meses, a menos que el estado de salud o el peso corporal aconsejen otra cosa.

▼B

1.6.3. **Oftalmología**

Para estudios de más de 28 días de duración, debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo equivalente adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, preferiblemente, de todos los animales, y al menos del lote con la dosis más alta y del lote de control. Si se observan cambios oculares o si los signos clínicos lo exigen, deben examinarse todos los demás animales. Para estudios a largo plazo, debe efectuarse una exploración oftalmológica a las 13 semanas. Las exploraciones oftalmológicas no serán necesarias si se conocen ya estos datos a partir de otros estudios de duración parecida y a dosis semejantes.

1.6.4. **Hematología y bioquímica clínica**

Cuando el estudio de neurotoxicidad se haga en combinación con un estudio de toxicidad sistémica por administración continuada, se practicarán exámenes hematológicos y determinaciones bioquímicas clínicas según lo indicado en el respectivo método del estudio de toxicidad sistémica. La recogida de muestras debe hacerse de tal manera que se reduzcan al mínimo los posibles efectos en el neurocomportamiento.

1.6.5. **Histopatología**

Los análisis neuropatológicos tienen que estar pensados de manera que complementen y amplíen las observaciones efectuadas durante la fase *in vivo* del estudio. Se fijarán *in situ* tejidos de, al menos, 5 animales por sexo y por grupo (véase el cuadro 1 y el parágrafo siguiente), utilizando técnicas de fijación y perfusión ampliamente reconocidas (véase la referencia 3 del capítulo 5 y la referencia 4 del capítulo 50). Deben registrarse todas las modificaciones macroscópicas observables. Cuando se trate de un estudio único independiente destinado a detectar neurotoxicidad o a caracterizar efectos neurotóxicos, el resto de los animales puede utilizarse o bien para otros procedimientos concretos de tipo electrofisiológico (10) (11) (16) (17), neuroquímico (10) (11) (14) (15), neuropatológico (10) (11) (12) (13) o neurocomportamental (10) (11) que puedan complementar los procedimientos y análisis descritos aquí o bien para aumentar el número de sujetos examinados para detectar histopatologías. Estos procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando las observaciones empíricas o los efectos previstos indiquen un tipo determinado o una diana de neurotoxicidad (2) (3). Otra posibilidad es utilizar el resto de los animales para las evaluaciones patólogicas habituales descritas en el método sobre estudios de toxicidad por administración continuada.

Se aplicará un procedimiento general de tinción, como hematoxilina-eosina, en todas las muestras de tejido incluidas en parafina y se hará un examen microscópico. Cuando se observen o se sospechen signos de neuropatía periférica, deberán examinarse muestras incluidas en plástico de tejido de nervios periféricos. Según los signos clínicos que aparezcan podrán examinarse otros tejidos o utilizarse procedimientos de tinción especiales. En (3) y (4) se dan orientaciones sobre otros tejidos que pueden examinarse. Pueden ser útiles también (18) otros colorantes especiales para demostrar determinados tipos de alteraciones patológicas.

▼B

Se someterán a examen histológico secciones representativas de los sistemas nerviosos central y periférico (véase la referencia 3 del capítulo 5 y la referencia 4 del capítulo 50). Las zonas examinadas tienen que incluir normalmente: el prosencéfalo, el centro del cerebro, incluida una sección del hipocampo, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia anular, el bulbo raquídeo, el ojo con el nervio óptico y la retina, la médula espinal en los engrosamientos cervical y lumbar, los ganglios de la raíz dorsal, las fibras de la raíz ventral y dorsal, el nervio ciático en su parte próxima (en la rodilla) y el nervio tibial en sus ramificaciones del músculo de la pantorrilla. Las secciones de la médula espinal y de los nervios periféricos tienen que incluir tanto una sección transversal como una longitudinal. Debe prestarse atención a la vasculatura del sistema nervioso. Se examinará también una muestra de músculo esquelético, especialmente del de la pantorrilla. Hay que prestar especial atención a las zonas de los sistemas nerviosos central y periférico con estructura celular y fibrosa que se sabe que resultan particularmente afectadas por neurotóxicos.

En las referencias (3) y (4) se dan orientaciones sobre las alteraciones neuropatológicas que derivan normalmente de la exposición a sustancias tóxicas. Se recomienda un examen por fases de las muestras de tejido empezando por una comparación de las secciones del lote de dosis alta con las del lote testigo. Si no se observan alteraciones neuropatológicas en las muestras de estos lotes, no se requieren más análisis. Si se observan alteraciones neuropatológicas en el lote de dosis alta, deben codificarse y examinarse secuencialmente muestras de cada uno de los tejidos posiblemente afectados pertenecientes a los lotes de dosis intermedia y baja.

Si en el examen cualitativo se encuentran pruebas de alteraciones neuropatológicas, se realizará otro examen en todas las regiones del sistema nervioso que muestren estas alteraciones. Deberán codificarse y examinarse al azar, sin conocimiento del código, secciones de todos los lotes de cada una de las regiones posiblemente afectadas. Debe registrarse la frecuencia y gravedad de cada lesión. Después de que todos los lotes hayan sido clasificados, puede revelarse el código y entonces pueden hacerse análisis estadísticos para evaluar relaciones dosis-respuesta. Deberán darse ejemplos que muestren diferentes niveles de gravedad de cada lesión.

Los resultados neuropatológicos tienen que evaluarse en el contexto de observaciones y mediciones del comportamiento, así como en relación con otros datos de estudios de toxicidad sistémica de la sustancia anteriores y realizados al mismo tiempo.

2. RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, tienen que resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo o testigo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de los signos observados, con inclusión del momento de su aparición, la duración y la gravedad de los efectos tóxicos, el número de animales que presenten lesiones, y el tipo y la gravedad de las lesiones.

▼B

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio deben evaluarse en lo que se refiere a la incidencia, gravedad y correlación de los efectos neurocomportamentales y neuropatológicos (así como a los efectos electrofisiológicos y neuroquímicos si se incluyen exámenes complementarios) y a cualquier otro efecto adverso observado. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y de amplia aceptación. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Sustancia estudiada:

— naturaleza física (incluyendo isomerismo, pureza y propiedades fisicoquímicas);

— identificación química.

Vehículo (si procede):

— motivación de la elección del vehículo.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, aclimatación, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— justificación de la selección de la dosis;

— justificación de la vía y la duración de la exposición,

— factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Procedimientos de observación y prueba:

— información detallada sobre la asignación de los animales de cada grupo a los subgrupos de perfusión,

— información detallada sobre los sistemas de puntuación, incluyendo criterios y escalas de puntuación para cada medición dentro de las observaciones clínicas detalladas,

▼B

— información detallada sobre las pruebas funcionales de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos); para la evaluación de la fuerza de prensión; para la evaluación de la actividad motriz (incluida información detallada sobre dispositivos automáticos para la detección de actividad); y otros procedimientos empleados,

— información detallada acerca de los exámenes oftalmológicos y, en su caso, los exámenes hematológicos y las pruebas bioquímicas clínicas con valores de referencia pertinentes,

— información detallada sobre procedimientos neurocomportamentales, neuropatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos.

Resultados:

— peso corporal/cambios en el peso corporal, incluyendo peso corporal en el momento del sacrificio,

— consumo de alimentos y de agua, en su caso,

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad y mortalidad,

— naturaleza, gravedad y duración (momento de aparición y evolución posterior) de las observaciones clínicas detalladas (reversibles o no),

— descripción pormenorizada de todos los resultados de las pruebas funcionales,

— resultados de la autopsia,

— descripción detallada de todos los resultados neurocomportamentales, neuropatológicos y neuroquímicos o electrofisiológicos, si se conocen,

— datos sobre la absorción, si los hay,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados

— información sobre la respuesta a la dosis,

— relación entre otros efectos tóxicos y la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia de ensayo,

— nivel sin efectos adversos observados.

Conclusiones

— se considera conveniente una declaración concreta sobre la neurotoxicidad general de la sustancia estudiada.

4. **REFERENCIAS**

1. OEDC Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OCDE, Paris. In preparation.

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principies and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9,691-704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principies of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.ToxicoL, 18, 343-352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, europathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Cuadro 1

Número mínimo de animales por grupo cuando el estudio de neurotoxicidad se realiza por separado o en combinación con otros estudios

	ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD			
	Como estudio aparte	Combinado con el estudio de 28 días	Combinado con el estudio de 90 días	Combinado con el estudio de toxicidad crónica
Número total de animales por lote	10 machos y 10 hembras	10 machos y 10 hembras	15 machos y 15 hembras	25 machos y 25 hembras
Número de animales seleccionados para pruebas funcionales incluidas observaciones clínicas detalladas	10 machos y 10 hembras	10 machos y 10 hembras	10 machos y 10 hembras	10 machos y 10 hembras
Número de animales seleccionados para perfusión *in situ y* neurohistopatología	5 machos y 5 hembras	5 machos y 5 hembras	5 machos y 5 hembras	5 machos y 5 hembras
Número de animales seleccionados para observaciones de toxicidad por administración continuada/subcrónica/crónica, hematología, bioquímica clínica, histopatología, etc., según lo indicado en las respectivas *Orientaciones.*		5 machos y 5 hembras	10 machos ([1]) y 10 hembras ([1])	20 machos ([1]) y 20 hembras ([1])
Observaciones complementarias, según corresponda	5 machos y 5 hembras			

([1]) Incluye 5 animales seleccionados para pruebas funcionales y observaciones clínicas detalladas dentro del estudio de neurotoxicidad.

▼B

Cuadro 2

Frecuencia de las observaciones y pruebas funcionales

Tipo de observaciones		Duración del estudio			
		T. aguda	28 días	90 días	T. crónica
En todos los animales	Estado general de salud	diariamente	diariamente	diariamente	diariamente
	Mortalidad/morbilidad	dos veces al día	dos veces al día	dos veces al día	dos veces al día
En animales seleccionados para observaciones funcionales	Observaciones clínicas detalladas	— antes de la primera exposición — dentro de las 8 horas siguientes a la administración en el momento estimado del efecto más agudo — el día 7 y 14 después de la administración	— antes de la primera exposición — una vez por semana a continuación	— antes de la primera exposición — una vez durante la primera o segunda semana de exposición — mensualmente a continuación	— antes de la primera exposición — una vez al final del primer mes de exposición — cada 3 meses a continuación
	Pruebas funcionales	— antes de la primera exposición — dentro de las 8 horas siguientes a la administración en el momento estimado del efecto más agudo — el día 7 y 14 después de la administración	— antes de la primera exposición — durante la cuarta semana de tratamiento tan cerca como sea posible del final del período de exposición	— antes de la primera exposición — una vez durante la primera o segunda semana de exposición — mensualmente a continuación	— antes de la primera exposición — una vez al final del primer mes de exposición — cada 3 meses a continuación

▼B

B.44. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VIVO*

1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 427 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

La exposición a muchas sustancias se produce principalmente a través de la piel, pero en la mayoría de los estudios toxicológicos efectuados con animales de laboratorio se utiliza la administración por vía oral. El estudio de absorción cutánea *in vivo* que se recoge en las presentes directrices permite la extrapolación a partir de los estudios orales cuando se efectúa la evaluación de la seguridad tras una exposición dérmica.

Antes de llegar a la circulación, las sustancias deben atravesar muchas capas de células de la piel. Para la mayoría de las sustancias, la capa que limita la tasa de esa incorporación es la capa córnea, formada por células muertas. La permeabilidad a través de la piel depende no solo de la lipofilia de la sustancia y del espesor de la capa exterior de la epidermis, sino también de otros factores, como el peso molecular y la concentración de la sustancia. En general, la piel de ratas y conejos es más permeable que la humana, mientras que la permeabilidad cutánea de cobayas y monos es más parecida a la nuestra.

Los métodos para medir la absorción cutánea pueden clasificarse en dos categorías: *in vivo* e *in vitro.* Los métodos *in vivo* pueden proporcionar buena información sobre la absorción cutánea de varias especies de laboratorio. Más recientemente se han elaborado métodos *in vitro.* Estos utilizan el transporte a través de piel humana o animal, con un espesor bien íntegro o bien parcial, hasta un depósito de líquidos. En otro método aparte (1) se describe el ensayo *in vitro.* Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre realización de estudios de absorción cutánea (2) para seleccionar el método más adecuado en cada situación, ya que en él se da más información sobre la idoneidad de los métodos tanto *in vivo* como *in vitro.*

El método *in vivo,* descrito en el presente texto, permite la determinación de la penetración de la sustancia problema a través de la piel hasta el compartimento sistémico. La técnica se utiliza ampliamente desde hace muchos años (3) (4) (5) (6) (7). Aunque en muchos casos pueden ser adecuados los estudios *in vitro* de absorción a través de la piel, es posible que haya situaciones en las que solo se puedan obtener los datos necesarios mediante estudios *in vivo.*

Las ventajas del método *in vivo* radican en que utiliza un sistema fisiológica y metabólicamente intacto, recurre a una especie común a muchos estudios de toxicidad y puede modificarse para utilizarlo con otras especies. Sus desventajas consisten en el uso de animales vivos, en la necesidad de utilizar sustancias radiomarcadas para conseguir unos resultados fiables, en las dificultades para determinar la fase de absorción precoz y en las diferencias de permeabilidad de la especie preferida (rata) respecto a la piel humana. La piel animal suele ser más permeable y, por tanto, puede llevar a una sobreestimación de la absorción a través de la piel humana (6) (8) (9). No deben ensayarse con animales vivos las sustancias cáusticas o corrosivas.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

Dosis no absorbida: la dosis lavada de la superficie cutánea tras la exposición y la presente en las protecciones no oclusivas, incluida la que se haya visto que se volatiliza de la piel durante la exposición.

Dosis absorbida *(in vivo):* la dosis presente en la orina, líquidos de lavado de la jaula, heces, aire espirado (si se mide), sangre, tejidos (si se recogen) y el resto del cuerpo, tras la eliminación de la piel correspondiente al lugar de aplicación.

Dosis absorbible: la dosis presente en la superficie o en el interior de la piel tras el lavado.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La sustancia problema, preferentemente radiomarcada, se aplica a la piel esquilada de los animales, a una o más dosis apropiadas, en forma de preparado representativo en uso. Se deja el preparado problema en contacto con la piel durante un plazo fijo bajo una protección adecuada (no oclusiva, semioclusiva u oclusiva) para evitar la ingestión del preparado. Al final del plazo de exposición, se quita la protección y se limpia la piel con un agente adecuado (tanto la protección como el material de lavado se conservan para su análisis), y se aplica otra protección. Los animales están alojados antes, durante y después del plazo de exposición en jaulas de metabolismo individuales y las excretas y el aire espirado en estos periodos se recogen para su análisis. Puede omitirse la recogida del aire espirado si se dispone de información suficiente sobre la ausencia o poca importancia de la formación de metabolitos radiactivos volátiles. En cada estudio participan normalmente varios grupos de animales que se exponen al preparado problema. Un grupo se sacrifica al final del período de exposición. Otros grupos se sacrifican posteriormente a intervalos programados (2). Al final del tiempo de muestreo se sacrifican los animales restantes, se recoge su sangre para analizarla, se extrae la piel de los lugares de aplicación para su análisis y se analiza también el resto del cuerpo para buscar las posibles sustancias no excretadas. Se efectúa la determinación de las muestras con los medios adecuados y se calcula el grado de absorción a través de la piel (6) (8) (9).

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

La rata es la especie más utilizada, pero también pueden emplearse cepas y especies sin pelo que presenten unas tasas de absorción cutánea más parecidas a las del hombre (3) (6) (7) (8) (9). Deben emplearse animales adultos jóvenes, con buena salud, de un solo sexo (en principio, machos) de cepas de laboratorio utilizadas normalmente. Al empezar el estudio, la variación del peso de los animales utilizados no debe superar el ± 20 % del peso medio. Por ejemplo, son adecuadas las ratas machos de 200 g–250 g, especialmente de la mitad superior de esta banda.

▼B

1.4.2. **Número y sexo de los animales**

Para cada preparado problema y cada tiempo programado de sacrificio debe utilizarse un grupo de al menos 4 animales del mismo sexo. Cada grupo de animales se sacrificará tras un plazo diferente, por ejemplo al final del plazo de exposición (normalmente 6 o 24 horas) y en momentos posteriores (por ejemplo, 48 y 72 horas). Si se dispone de datos que demuestren la existencia de diferencias importantes en cuanto a la toxicidad dérmica entre machos y hembras, se elegirá el sexo más sensible. En ausencia de tales datos, puede utilizarse cualquiera de los sexos.

1.4.3. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ºC (± 3 ºC). Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio; la cantidad no debe estar limitada, y tampoco el suministro de agua potable. Durante el estudio y, de preferencia, también durante la fase de aclimatación, los animales se alojarán en jaulas de metabolismo individuales. Como el vertido de agua y piensos puede afectar a los resultados, debe reducirse al mínimo la probabilidad de que ocurra.

1.4.4. **Preparación de los animales**

Los animales se marcan para identificarlos individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes del inicio del estudio, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

Tras la fase de aclimatación, y unas 24 horas antes de la administración de la sustancia, se esquila una zona de piel de los hombros y del dorso de cada animal. Las propiedades de permeabilidad de la piel lesionada son diferentes de las de la piel intacta, por lo que debe procurarse no excoriar la piel. Una vez efectuado el esquileo y unas 24 horas antes de la aplicación de la sustancia problema a la piel (véase el punto 1.4.7), la superficie cutánea debe limpiarse con acetona para eliminar el sebo cutáneo. No se recomienda limpiar con agua y jabón porque un eventual resto de jabón podría aumentar la absorción de la sustancia problema. La superficie debe ser lo bastante grande para permitir un cálculo fiable de la cantidad absorbida de sustancia problema por centímetro cuadrado de piel, por lo que, de preferencia, ha de tener un mínimo de 10 cm^2. Esta superficie puede conseguirse con ratas de 200-250 g de peso corporal. Tras esta preparación, los animales se devuelven a las jaulas de metabolismo.

1.4.5. **Sustancia problema**

La sustancia problema es aquella cuyas características de penetración se van a estudiar. Lo mejor es que la sustancia problema esté radiomarcada.

1.4.6. **Preparación de las pruebas**

El preparado de la sustancia problema (por ejemplo, material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser el mismo (o un análogo realista) que aquel al que pueda verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Deben justificarse las eventuales desviaciones respecto al preparado «en uso». En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. En caso de que el vehículo sea distinto al agua, deben conocerse sus características de absorción y su posible interacción con la sustancia problema.

▼B

1.4.7. **Aplicación a la piel**

Se delimita en la piel el lugar de aplicación, con una superficie específica. Después se aplica de forma homogénea en ese lugar una cantidad conocida del preparado problema. Esta cantidad debe reflejar en principio la posible exposición humana, normalmente de 1 a 5 mg/cm^2 en caso de preparado sólido o hasta 10 µl/cm^2 en caso de líquidos. Si se emplean otras cantidades, hay que justificarlo en función de las condiciones previstas de uso, de los objetivos del estudio o de las características físicas del preparado problema. Tras la aplicación, hay que proteger el sitio tratado para que el animal no se lo frote. En la figura 1 se muestra un ejemplo de dispositivo clásico. Normalmente, el lugar de aplicación ha de llevar una protección no oclusiva (por ejemplo, una gasa de nailon permeable). Sin embargo, si la dosis es muy grande hay que ocluir el lugar de aplicación. En caso de que la evaporación de sustancias problema semivolátiles reduzca la tasa de recuperación de la sustancia problema hasta extremos inaceptables (véase también el párrafo primero del punto 1.4.10), será necesario recoger la sustancia evaporada en un filtro de carbón activo que recubra el dispositivo de aplicación (véase la figura 1). Es importante que los eventuales dispositivos no lesionen la piel, ni absorban el preparado problema ni reaccionen con él. Los animales se devuelven a sus jaulas de metabolismo individuales para recoger las excretas.

1.4.8. **Duración de la exposición y toma de muestras**

La duración de la exposición es el plazo entre la aplicación y la eliminación del preparado problema mediante lavado de la piel. El plazo de exposición debe tener una duración apropiada (normalmente 6 o 24 horas), según la duración prevista de la exposición humana. Tras la exposición, los animales se mantienen en las jaulas de metabolismo hasta el momento previsto para su sacrificio. De forma periódica a lo largo de toda la duración del estudio, hay que observar si los animales presentan signos de toxicidad o reacciones anormales. Al final de la exposición, hay que ver si la piel tratada presenta signos visibles de irritación.

Las jaulas de metabolismo deben permitir la recogida aparte de la orina y las heces a lo largo de todo el estudio. También deben permitir la recogida de dióxido de carbono ^{14}C y de compuestos volátiles de carbono ^{14}C, que deben analizarse si se producen en gran cantidad (> 5 %). La orina, las heces y los fluidos recogidos (por ejemplo, dióxido de carbono ^{14}C y compuestos volátiles de carbono ^{14}C) deben tomarse por separado de cada grupo y en cada momento de muestreo. Si se sabe con suficiente seguridad que la formación de metabolitos radiactivos volátiles es nula o muy limitada, pueden utilizarse jaulas abiertas.

Las excretas se recogen durante la exposición, hasta 24 horas tras el contacto inicial con la piel, y después cada día hasta el final del experimento. Aunque en principio es suficiente con tres intervalos de recogida de excretas, la finalidad prevista del preparado problema o los eventuales datos cinéticos pueden indicar la necesidad de utilizar intervalos adicionales o más adecuados para el estudio.

Al final de la exposición se retira el dispositivo protector de cada animal, y se conserva aparte para su análisis. La piel tratada de todos los animales debe lavarse al menos tres veces con un agente de limpieza, utilizando hisopos adecuados. Debe procurarse no contaminar otras partes del cuerpo. El agente de limpieza debe ser representativo de la práctica higiénica normal; por ejemplo, puede consistir en una solución acuosa de jabón. Por último, hay que secar la piel. Todos los hisopos y líquidos de lavado se guardan para su análisis. Antes de devolver los animales a sus jaulas individuales, se les aplica una protección nueva en el lugar del tratamiento, en caso de que formen parte de grupos que se vayan a estudiar posteriormente.

▼B

1.4.9. **Procedimiento final**

Los distintos animales de cada grupo se sacrificarán en el momento previsto y se recogerá su sangre para analizarla. El apósito o dispositivo protector se recogerá para su análisis. De cada animal se tomará la piel del lugar de aplicación y una superficie similar de piel esquilada que no haya recibido la sustancia, y se analizarán por separado. El lugar de aplicación podrá fraccionarse para separar la capa córnea de la epidermis subyacente, a fin de obtener más información sobre la distribución de la sustancia. La determinación de esta distribución a lo largo del tiempo tras la exposición debe indicar el destino de cualquier sustancia problema en la capa córnea. Para facilitar el fraccionamiento de la piel (tras el lavado final de esta y el sacrificio del animal), se retirarán todos los dispositivos protectores. Se extirpará de la rata la piel del lugar de aplicación, con una banda anular de piel adyacente, y se sujetará en un tablero con alfileres. Con una presión suave se aplicará a la superficie de la piel un trozo de cinta adhesiva, que se retirará junto con parte de la capa córnea. Se aplicarán trozos sucesivos de cinta hasta que esta deje de adherirse a la superficie de la piel, momento en que se habrá retirado la totalidad de la capa córnea. Todos los trozos de cinta procedentes de un mismo animal podrán reunirse en un solo envase al que se añadirá un agente para digerir tejidos, a fin de solubilizar la capa córnea. Los posibles tejidos diana se podrán recoger para someterlos a mediciones aparte antes de proceder a la determinación de la dosis absorbida en el cuerpo restante. Se conservarán los cuerpos de los distintos animales para su análisis. Normalmente será suficiente realizar el análisis del contenido total. Los órganos diana se podrán recoger para someterlos a análisis aparte (si así lo indican otros estudios). La orina presente en la vejiga en el momento del sacrificio programado se añadirá a la orina recogida previamente. Tras la recogida de las excretas de las jaulas de metabolismo en el momento del sacrificio programado, las jaulas y los colectores se lavarán con un disolvente adecuado. El resto del material que pueda estar contaminado se analizará análogamente.

1.4.10. **Análisis**

En todos los estudios debe conseguirse una recuperación adecuada (es decir, una media del 100 ± 10 % de la radiactividad). Deberán justificarse los casos en que la recuperación no esté en dicha banda. La cantidad de la dosis administrada presente en cada muestra se analizará mediante métodos validados adecuadamente.

El estudio estadístico debe incluir una medida de la varianza entre las réplicas de cada aplicación.

2. **DATOS**

Deben hacerse las siguientes mediciones con cada animal, en cada tiempo de muestreo, respecto a la sustancia problema y sus metabolitos (además de los datos individuales, deben comunicarse en forma de media los datos agrupados por tiempos de muestreo):

— cantidad relativa a los dispositivos protectores,

— cantidad que puede extraerse de la piel,

— cantidad en el interior o en la superficie de la piel que no puede retirarse mediante lavado,

▼B

— cantidad en la sangre de la muestra,

— cantidad en las excretas y en el aire espirado (en su caso),

— cantidad restante en el cuerpo y en los eventuales órganos tomados para su análisis aparte.

La cantidad de sustancia problema y sus metabolitos presente en las excretas, aire espirado, sangre y cuerpo permitirá la determinación de la cantidad total absorbida en cada intervalo. También puede calcularse la cantidad de sustancia problema absorbida por centímetro cuadrado de piel expuesta a la sustancia problema a lo largo del tiempo de exposición.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir los requisitos establecidos en el protocolo, con una justificación del sistema de ensayo utilizado y con los datos siguientes:

Sustancia de ensayo:

— datos de identificación [por ejemplo, número CAS, si se conoce; origen; pureza (pureza radioquímica); impurezas conocidas; número de lote],

— naturaleza física, propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, pH, volatilidad, solubilidad, estabilidad, peso molecular y log P_{ow}).

Preparado problema:

— formulación y justificación del uso,

— datos del preparado problema, cantidad aplicada, concentración conseguida, vehículo, estabilidad y homogeneidad.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— datos de la administración del preparado problema (lugar de la aplicación, métodos de determinación, oclusión/no oclusión, volumen, extracción, detección),

— datos de la calidad de los alimentos y del agua.

Resultados:

— eventuales signos de toxicidad,

— cuadros de datos de absorción (expresados en tasa, cantidad o porcentaje),

▼B

— porcentaje de recuperación total del experimento,

— interpretación de los resultados, comparación con otros datos eventualmente disponibles sobre la absorción de la sustancia problema a través de la piel.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

1. Método de ensayo B.45. Absorción cutánea: método *in vitro.*

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

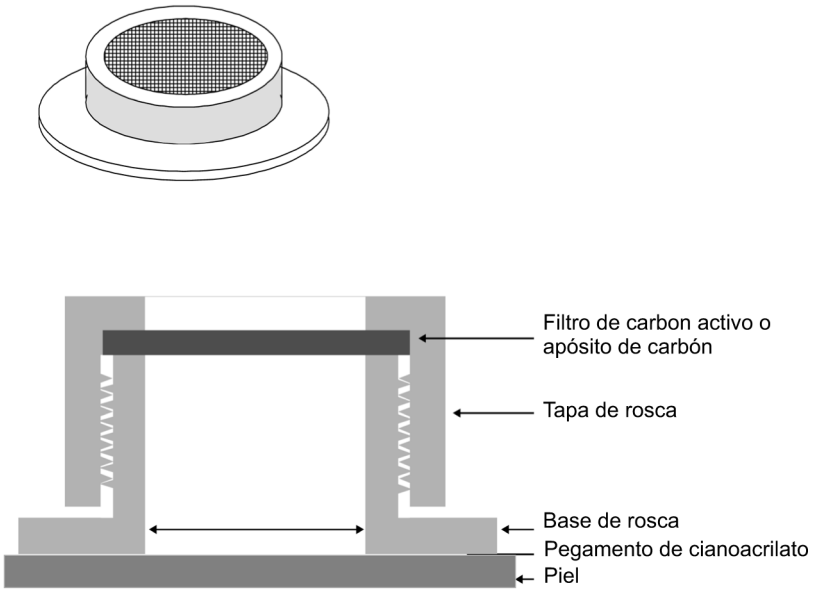
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

Figura 1

Ejemplo de diseño de dispositivo clásico utilizado para definir y proteger el lugar de aplicación dérmica en los estudios *in vivo* de absorción a través de la piel



▼B

B.45. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VITRO*

1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 428 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente método es proporcionar información sobre la absorción de una sustancia problema aplicada a la piel extirpada. Puede combinarse con el método *in vivo* del ensayo de absorción cutánea (1) o realizarse independientemente. Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre realización de estudios de absorción cutánea (2), que puede servir de ayuda para la concepción de estudios basados en este método de ensayo. El documento orientativo se ha preparado para facilitar la selección de los procedimientos *in vitro* adecuados según las distintas circunstancias, a fin de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos con este método.

Los métodos para medir la absorción cutánea y la transferencia dérmica pueden clasificarse en dos categorías: *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vivo* están bien comprobados y proporcionan información farmacocinética con una serie de especies animales. En otro método aparte (1) se describe un ensayo *in vivo*. Se lleva muchos años utilizando también métodos *in vitro* para medir la absorción cutánea. Aunque no se han efectuado estudios oficiales de validación de los ensayos *in vitro* correspondientes al presente método de ensayo, los expertos de la OCDE consideraron en 1999 que se disponía de suficientes datos evaluados para apoyar el método *in vitro* (3). En el documento orientativo (2) se incluye más información que avala este apoyo, con inclusión de un número significativo de comparaciones directas de métodos *in vitro* e *in vivo*. Hay una serie de monografías que examinan este aspecto y proporcionan datos pormenorizados sobre el uso de un método *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Los métodos *in vitro* miden la difusión de sustancias a la piel y, a través de esta, hasta un depósito de líquidos, y pueden utilizar piel muerta para medir solo la difusión, o piel reciente, activa metabólicamente, para medir simultáneamente la difusión y el metabolismo cutáneo. Tales métodos se utilizan particularmente en el cribado para comparar la transferencia de sustancias a la piel y a través de esta desde distintas formulaciones, y también pueden proporcionar modelos útiles para la evaluación de la absorción a través de la piel humana.

Es posible que el método *in vitro* no se pueda aplicar a todas las situaciones ni a todas las clases de sustancias. Quizá se pueda utilizar el método de ensayo *in vitro* para una evaluación cualitativa inicial de la penetración cutánea. En algunos casos puede ser necesario completarla con datos *in vivo*. Debe consultarse el documento orientativo (2) para considerar las situaciones en que pueda ser adecuado el método *in vitro*. En (3) se encuentra más información detallada para avalar la decisión.

El presente método presenta los principios generales para medir la absorción cutánea y la transferencia de una sustancia problema utilizando piel extirpada. Puede utilizarse piel procedente de muchas especies de mamíferos, incluido el hombre. Las propiedades de permeabilidad de la piel se mantienen tras su extirpación del cuerpo porque la principal barrera contra la difusión es la capa córnea, formada por células muertas, ya que no se ha encontrado transporte activo de sustancias a través de la piel. Se ha visto que la piel es capaz de metabolizar ciertas sustancias durante la absorción a través de ella (6), pero este proceso no es limitante en cuanto a la tasa de la dosis absorbida realmente, aunque puede afectar a la naturaleza de la sustancia que llega a la corriente sanguínea.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

dosis no absorbida la dosis lavada de la superficie cutánea tras la exposición y la presente en las protecciones no oclusivas, además de la que se haya visto que se volatiliza de la piel durante la exposición;

dosis absorbida *(in vitro)* la masa de sustancia problema que llega al líquido receptor o a la circulación sistémica dentro de un plazo especificado;

dosis absorbible *(in vitro)* la dosis presente en la superficie o en el interior de la piel tras el lavado.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La sustancia problema, que puede estar radiomarcada, se aplica a la superficie de una muestra de piel que separa las dos cámaras de una célula de difusión. La sustancia permanece sobre la piel durante un tiempo dado, en condiciones determinadas, antes de eliminarse mediante un procedimiento adecuado de limpieza. Se toman muestras del líquido receptor a ciertos intervalos a lo largo del experimento y se determina su contenido en sustancia problema y metabolitos de esta.

Cuando se utilizan sistemas metabólicamente activos, pueden analizarse con métodos adecuados los metabolitos de la sustancia problema. Al final del experimento se cuantifica la distribución de la sustancia problema y sus metabolitos, en su caso.

Aplicando las condiciones adecuadas, descritas en este método y en el documento orientativo (2), se mide la absorción de la sustancia problema durante un plazo determinado mediante el análisis del líquido receptor y de la piel tratada. La sustancia problema que permanece en la piel debe considerarse absorbida, salvo que se demuestre que la absorción se puede determinar a partir de solo los valores del líquido receptor. El análisis de los otros componentes (material extraído de la piel por lavado y material restante dentro de las capas de la piel) permite una evaluación de los datos más avanzada, con inclusión de la distribución de toda la sustancia problema y el porcentaje de recuperación.

Para demostrar la eficacia y fiabilidad del sistema de ensayo en el laboratorio que lo aplique, debe disponerse de los resultados correspondientes a sustancias de referencia apropiadas, los cuales deben concordar con los publicados en la bibliografía en relación con el método utilizado. Este requisito puede cumplirse sometiendo a ensayo una sustancia de referencia apropiada (de preferencia con una lipofilia similar a la de la sustancia problema) en paralelo con esta, o bien presentando datos previos adecuados sobre una serie de sustancias de referencia de lipofilia diferente (por ejemplo, cafeína, ácido benzoico y testosterona).

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.4.1. **Célula de difusión**

Una célula de difusión consiste en una cámara donadora y una cámara receptora, entre las que se coloca la piel (en la figura 1 se muestra un ejemplo de disposición normal). La célula debe quedar bien cerrada alrededor de la piel, permitir con facilidad la toma de muestras y la mezcla adecuada de la solución receptora en contacto con la parte inferior de la piel, así como un buen control de la temperatura de la célula y de su contenido. Son válidas tanto las células de difusión estática como las de difusión dinámica. En principio, las cámaras donadoras se dejan sin ocluir durante la exposición a una dosis pequeña de un preparado problema. Sin embargo, con las aplicaciones de grandes dosis, y en ciertos casos de pequeñas dosis, es posible que las cámaras donadoras queden ocluidas.

▼B

1.4.2. **Líquido receptor**

Se recomienda el uso de un líquido receptor fisiológicamente adecuado, aunque también es posible utilizar otros en casos justificados. Debe indicarse la composición exacta del líquido receptor. Debe demostrarse que la sustancia problema es suficientemente soluble en el líquido receptor, de forma que este no actúe de barrera contra la absorción. Además, el líquido receptor no debe afectar a la integridad del preparado de piel. En un sistema dinámico, el caudal no debe dificultar la difusión de la sustancia problema al líquido receptor. En un sistema estático, hay que agitar continuamente el líquido y tomar muestras de él periódicamente. Si se estudia el metabolismo, el líquido receptor debe permitir que la piel siga estando viva a lo largo de todo el experimento.

1.4.3. **Preparados de piel**

Puede utilizarse piel de origen humano o animal. Se sabe que el uso de piel humana es objeto de condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales. Aunque se prefiere la piel viva, también puede utilizarse piel muerta, siempre que pueda demostrarse su integridad. Son válidas las membranas epidérmicas (separadas enzimática, térmica o químicamente) o la piel con la epidermis y parte de la dermis (normalmente de 200 a 400 μm de espesor), preparadas con un dermatomo. Puede utilizarse piel completa (con la epidermis y toda la dermis), pero ha de evitarse el espesor excesivo (aprox. > 1 mm), salvo que sea necesario específicamente para la determinación de la sustancia problema en las capas de la piel. Deben justificarse la elección de la especie, el lugar anatómico y la técnica de preparación. Es necesario conseguir datos aceptables de un mínimo de cuatro ensayos en paralelo de cada preparado problema.

1.4.4. **Integridad del preparado de piel**

Es fundamental que la piel se prepare adecuadamente. Un tratamiento inapropiado puede provocar lesiones en la capa córnea, por lo que debe comprobarse la integridad de la piel preparada. Si se investiga el metabolismo de la piel, debe utilizarse lo antes posible piel recién extirpada, y en condiciones que permitan la actividad metabólica. Como norma general, la piel recién extirpada debe utilizarse en el plazo de 24 horas, pero el plazo de conservación aceptable puede variar en función del sistema enzimático que intervenga en la metabolización y de la temperatura de conservación (13). En caso de que los preparados de piel no sean recientes cuando se vayan a utilizar, deben presentarse pruebas de que mantienen la función de barrera.

1.4.5. **Sustancia problema**

La sustancia problema es aquella cuyas características de penetración se van a estudiar. Lo mejor es que la sustancia problema esté radiomarcada.

1.4.6. **Preparado problema**

El preparado de la sustancia problema (por ejemplo, material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser el mismo (o un análogo realista) que aquel al que pueda verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Deben justificarse las eventuales desviaciones respecto al preparado «en uso».

▼B

1.4.7. **Concentraciones y formulaciones de las sustancias problema**

Normalmente se utiliza más de una concentración de la sustancia problema, en la banda superior de la posible exposición humana. Análogamente, debe considerarse someter a ensayo una gama de formulaciones representativas.

1.4.8. **Aplicación a la piel**

En condiciones normales de exposición humana a las sustancias químicas, se suelen encontrar dosis pequeñas. Por tanto, debe aplicarse una cantidad que refleje la exposición humana, normalmente 1-5 mg/cm^2 de piel en caso de sólidos y hasta 10 $\mu l/cm^2$ en caso de líquidos. La cantidad debe justificarse en función de las condiciones previstas de uso, de los objetivos del estudio o de las características físicas del preparado problema. Por ejemplo, las aplicaciones a la superficie cutánea pueden ser de grandes dosis cuando se aplican volúmenes importantes por unidad de superficie.

1.4.9. **Temperatura**

La difusión pasiva de sustancias (y, en consecuencia, su absorción por la piel) depende de la temperatura. La cámara de difusión y la piel deben mantenerse a temperatura constante, cerca de la temperatura normal de la piel (32 ± 1 ºC). Según el diseño de la célula, será necesario tener temperaturas diferentes en el baño de agua o en el bloque de calentamiento para garantizar que el receptor y la piel están en condiciones fisiológicas. La humedad debe situarse de preferencia entre el 30 y el 70 %.

1.4.10. **Duración de la exposición y toma de muestras**

La exposición de la piel al preparado problema puede mantenerse durante todo el experimento o bien durante plazos más breves (para imitar un tipo específico de exposición humana). El exceso del preparado problema debe lavarse de la piel con un agente de limpieza adecuado y los líquidos de lavado se deben recoger para su análisis. El procedimiento de eliminación del preparado problema dependerá de las condiciones previstas de uso, y debe justificarse. Normalmente hace falta tomar muestras durante un período de 24 horas, para poder caracterizar de forma adecuada la variación de la absorción. Como la integridad de la piel puede empezar a fallar a partir de las 24 horas, el muestreo no debe durar en principio más de ese tiempo. En caso de sustancias problema que penetran rápidamente en la piel, esto puede no ser necesario, pero con sustancias problema que penetran despacio es posible que haga falta un plazo más prolongado. La frecuencia de la toma de muestras de líquido receptor debe permitir la representación gráfica de la variación de la absorción de la sustancia problema.

1.4.11. **Procedimiento final**

Hay que analizar todos los componentes del sistema de ensayo y determinar la recuperación. Se incluyen la cámara donadora, los líquidos de lavado de la superficie de la piel, el preparado de piel y la cámara con el líquido receptor. En ciertos casos, la piel puede fraccionarse en superficie expuesta y en superficie bajo las pestañas de la célula, y en capa córnea, epidermis y dermis, para efectuar análisis aparte.

1.4.12. **Análisis**

En todos los estudios debe conseguirse una recuperación adecuada (el objetivo es conseguir una media del 100 ± 10 % de la radiactividad, y habrá que justificar las eventuales desviaciones). Debe analizarse la cantidad de sustancia problema que se encuentra en el líquido receptor, en el preparado de piel, en los líquidos de lavado de la superficie de la piel y en el líquido de lavado del material, utilizando una técnica adecuada.

▼B

2. **DATOS**

Deben indicarse el análisis del líquido receptor, la distribución de la sustancia problema en el sistema de ensayo y la variación de la absorción a lo largo del tiempo. Cuando se utilizan condiciones de exposición con dosis pequeñas, deben calcularse la cantidad lavada de la piel, la cantidad ligada a la piel (y a las diferentes capas de piel, si se analizan por separado) y la cantidad presente en el líquido receptor (tasa, y cantidad o porcentaje de la dosis aplicada). La absorción de la piel puede expresarse a veces utilizando solo datos del líquido receptor. Sin embargo, si al final del estudio queda sustancia en la piel, puede ser necesario tenerlo en cuenta para calcular la cantidad total absorbida [véase el punto 66 de la referencia (3)]. Cuando se utilizan condiciones de exposición con dosis grandes, los datos pueden permitir el cálculo de una constante de permeabilidad (Kp). En estas últimas condiciones, no es importante el porcentaje absorbido.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir los requisitos establecidos en el protocolo, con una justificación del sistema de ensayo utilizado y con los datos siguientes:

Sustancia problema:

— naturaleza física, propiedades fisicoquímicas (al menos, peso molecular y log P_{ow}), pureza (pureza radioquímica),

— información para la identificación (por ejemplo, número de lote),

— solubilidad en el líquido receptor.

Preparado problema:

— formulación y justificación del uso,

— homogeneidad.

Condiciones de ensayo:

— procedencia y lugar de la piel, método de preparación, condiciones de conservación antes del uso, tratamientos previos eventuales (limpieza, tratamiento con antibióticos, etc.), medidas de la integridad de la piel, situación metabólica, justificación del empleo,

— diseño de la célula de difusión, composición del líquido receptor, caudal de líquido receptor o momentos y procedimientos de la toma de muestras,

— datos sobre la aplicación del preparado problema y cuantificación de la dosis aplicada,

— duración de la exposición,

— datos de la eliminación del preparado problema de la piel, como, por ejemplo, lavado de esta,

— datos del análisis de la piel y de las eventuales técnicas de fraccionamiento empleadas para poner de manifiesto la distribución en la piel,

▼B

— método de lavado de la célula de difusión y del material,

— métodos de determinación, técnicas de extracción, límites de detección y validación del método analítico.

Resultados:

— recuperación total del experimento (dosis aplicada ≡ líquidos de lavado de la piel + piel + líquido receptor + líquidos de lavado de la célula),

— cuadros de recuperaciones de las distintas células de difusión en cada compartimento,

— variación de la absorción,

— cuadros de datos de absorción (expresados en tasa, cantidad o porcentaje),

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

1. Método de ensayo B.44. Absorción cutánea: método *in vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, FdChem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

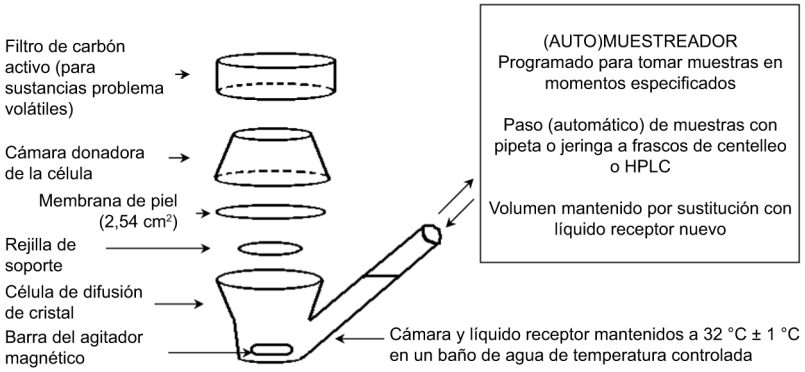
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Ejemplo de diseño clásico de célula de difusión estática para estudios *in vitro* de absorción a través de la piel



▼M3

B.46. IRRITACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO:* MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA

INTRODUCCIÓN

1. La irritación cutánea se refiere a la producción de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema durante un período de hasta 4 horas [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos y del Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (1) (3)]. El presente método de ensayo (ME) proporciona un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse para identificar el peligro de productos químicos irritantes (sustancias y mezclas) de acuerdo con la categoría 2 del SGA de la ONU y del sistema de clasificación, etiquetado y envasado (CLP, de su nombre en inglés) de la UE (1) (2) (3). En la UE y en otras regiones que no han adoptado la categoría 3 optativa del SGA de la ONU (irritantes suaves), el presente ME puede utilizarse también para identificar productos químicos no clasificados, es decir, los «sin categoría» del SGA de la ONU y del CLP de la UE (1) (3). El presente ME puede emplearse para determinar la capacidad de irritación cutánea de los productos químicos, como un ensayo independiente de sustitución del ensayo de irritación cutánea *in vivo*, dentro de una estrategia de evaluación secuencial (punto 4 y capítulo B.4 del presente anexo).

2. La evaluación de la irritación cutánea, generalmente, ha implicado el uso de animales de laboratorio (véase la TG 404 de la OCDE, capítulo B.4 del presente anexo) (4). Respondiendo a la preocupación por el bienestar de los animales, el ME B.4 se revisó en 2004 para tener en cuenta la determinación de la corrosión o irritación cutánea aplicando una estrategia de ensayos secuenciales, utilizando métodos de ensayo validados *in vitro* o *ex vivo*, lo que evita infligir daños y sufrimiento a los animales. ►C1 Se han adoptado como TG 430, 431 y 435 de la OCDE ◄ tres métodos de ensayo *in vitro* validados (5) (6) (7), y dos de ellos como capítulos B.40 y B.40 *bis* del presente anexo, para su uso en la parte correspondiente a la corrosión de la estrategia de evaluación secuencial del capítulo B.4 o de la TG 404 de la OCDE (4).

3. El presente ME se refiere al efecto sobre la salud humana denominado irritación cutánea. Se basa en la epidermis humana reconstruida (EhR), que, en su diseño general (utilización de queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, como origen de las células, y de un tejido y una arquitectura celular representativos), imita bien las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las capas superiores de la piel humana, es decir, la epidermis. Este ME incluye también un conjunto de normas de comportamiento (NC) (apéndice 2) para la evaluación de métodos similares y modificados, basados en la EhR, y desarrollados por el CEVMA de la Comisión Europea (8), de acuerdo con los principios del documento de orientación nº 34 de la OCDE (9).

4. Hay tres métodos validados que se adhieren al presente ME. Se han completado los estudios de prevalidación, optimización y validación de un método *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), que utiliza un modelo de EhR, disponible comercialmente como EpiSkin™ (designado como método validado de referencia – MVR). Los otros dos métodos de irritación cutánea *in vitro* con EhR, disponibles comercialmente, han mostrado resultados similares a los del MVR según una validación basada en NC (21); se trata de los métodos EpiDerm™ SIT (EPI-200) y SkinEthic™ RHE (22).

▼**M3**

5. Antes de poder utilizar con fines normativos un método con EhR *in vitro* distinto del MVR, del EpiDerm™ SIT (EPI-200) y del SkinEthic™ RhE, es necesario determinar su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones respecto al objetivo perseguido, a fin de garantizar que puede considerarse similar al MVR, de acuerdo con los requisitos de las NC establecidas en el presente ME (apéndice 2). Por otra parte, se recomienda consultar el documento explicativo de base de la OCDE sobre los ensayos de irritación cutánea *in vitro* antes de desarrollar y validar un método de EhR *in vitro* similar o modificado y de presentarlo para su adopción reglamentaria (23).

DEFINICIONES

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

7. Una limitación del ME, puesta de manifiesto en el estudio de validación (16), es que no permite la clasificación de los productos químicos en la categoría 3 optativa del SGA de la ONU (irritantes suaves) (1). Cuando se utilice como ensayo de sustitución parcial, es posible que se exija la realización de ensayos de seguimiento *in vivo*, para caracterizar plenamente el potencial de irritación cutánea (4 y capítulo B.4 del presente anexo). Se reconoce que el uso de piel humana está sujeto a condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales.

8. El presente ME se refiere al componente de irritación cutánea *in vitro* de la estrategia de ensayos secuenciales del ME B.4 (TG 404 de la OCDE) sobre corrosión o irritación cutánea (4). Aunque el presente ME no aporta información adecuada sobre la corrosión cutánea, ha de observarse que el ME B.40 *bis* (TG 431 de la OCDE) sobre corrosión cutánea se basa en el mismo sistema de ensayo con EhR, si bien utilizando un protocolo distinto (capítulo B.40 *bis*). El presente ME se basa en modelos de EhR que utilizan queratinocitos humanos, los cuales, por lo tanto, representan *in vitro* el órgano diana de la especie de interés. Además, cubre directamente la fase inicial de la cascada inflamatoria o mecanismo de acción (el daño celular y el daño tisular que provocan traumatismo localizado) que sucede durante la irritación *in vivo*. Durante la validación del presente ME se ha sometido a ensayo una amplia variedad de productos químicos, y la base de datos empíricos del estudio de validación contaba con 58 sustancias en total (16) (18) (23). El ME es aplicable a sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Cuando sea posible, deberán triturarse los sólidos para transformarlos en polvo fino antes de su aplicación; no es necesario realizar ningún otro tratamiento previo de la muestra. Aún no se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles (24). Aunque no hay que descartar que estos tipos de sustancias puedan estudiarse utilizando la tecnología de EhR, el ME actual no permite ensayar gases ni aerosoles. Ha de señalarse asimismo que los productos químicos muy coloreados pueden interferir con la medición de la viabilidad celular, lo que haría necesario utilizar controles adaptados para corregir esta interferencia (véanse los puntos 24 a 26).

9. Una sola tanda de ensayos, formada por tres réplicas del tejido, debería ser suficiente para una sustancia problema, si la clasificación es inequívoca. Sin embargo, en casos de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas o el de un porcentaje de viabilidad media igual al 50 ± 5 %, debería plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.

▼M3

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. La sustancia problema se aplica tópicamente a un modelo de EhR tridimensional, formado por queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, que se han cultivado para formar un modelo de la epidermis humana bien diferenciado en varias capas. Consiste en las capas organizadas basal, espinosa y granulosa, y en un estrato córneo con varias capas intercelulares laminares de lípidos, que representan las principales clases de lípidos, análogas a las que se encuentran *in vivo*.

11. La irritación cutánea inducida por un producto químico, que se manifiesta como eritema y edema, es el resultado de una cascada de acontecimientos que se inicia con la penetración en el estrato córneo y el daño en las capas subyacentes de los queratinocitos. Los queratinocitos que van muriendo liberan mediadores que inician la cascada inflamatoria, la cual actúa sobre las células de la dermis, particularmente las células estrómicas y endoteliales. La dilatación y el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales son los factores que producen el eritema y el edema observados (24). Los métodos basados en la EhR miden los acontecimientos que inician la cascada.

12. La viabilidad celular de los modelos de EhR se determina por la transformación enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] en una sal azul de formazano que se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (25). Las sustancias irritantes se identifican por su capacidad de reducir la viabilidad celular por debajo de unos umbrales definidos (es decir, ≤ 50 %, en el caso los de irritantes de la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE). En función del marco normativo en que se utilicen los resultados de este ME, los productos químicos que producen viabilidades celulares por encima del nivel umbral definido, pueden considerarse no irritantes (es decir, > 50 %, «sin categoría»).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

13. Antes de proceder al uso sistemático de cualquiera de los tres métodos validados que se adhieren al presente ME, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias de referencia que se recogen en el cuadro 1. En caso de métodos similares desarrollados con arreglo al presente ME o de modificaciones de cualquiera de los tres métodos validados, antes de utilizar el método para ensayos normativos es necesario cumplir los requisitos de las normas de comportamiento descritos en el apéndice 2 del presente ME.

14. Como parte del ejercicio de demostración de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del fabricante del modelo de EhR. Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método y se haya demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice sistemáticamente un método, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

Cuadro 1

Sustancias de referencia ([1])

Sustancia	Nº CAS	Puntuación *in vivo* ([2])	Estado físico	Categoría del SGA de la ONU o del CLP de la UE
Ácido naftaleno-acético	86-87-3	0	Sólido	Sin categoría
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Sin categoría

▼M3

Sustancia	Nº CAS	Puntuación *in vivo* (2)	Estado físico	Categoría del SGA de la ONU o del CLP de la UE
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Sin categoría
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Sin categoría *(Categoría optativa 3)* (3) (4)
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Sin categoría *(Categoría optativa 3)* (3) (4)
Aldehído ciclámico	103-95-7	2,3	Líquido	Cat. 2
1-Bromohexano	111-25-1	2,7	Líquido	Cat. 2
Hidróxido de potasio (solución acuosa al 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Líquido	Cat. 2

(1) Estas sustancias de referencia son un subconjunto de las sustancias de referencia utilizadas en el estudio de validación.
(2) Puntuación *in vivo* de acuerdo con el ME B.4 y la TG 404 de la OCDE (4).
(3) Según el presente método de ensayo, la categoría optativa 3 del SGA de la ONU (irritante suave) (1) no se considera como categoría.
(4) La categoría optativa 3 del SGA de la ONU no es aplicable según el sistema CLP de la UE.

PROCEDIMIENTO

15. A continuación se recoge una descripción de los componentes y procedimientos de un método con modelo de EhR para evaluar la irritación cutánea. El modelo de EHR debe reconstruirse, y puede prepararse en el propio laboratorio u obtenerse comercialmente. Existen procedimientos de trabajo normalizados disponibles para el EpiSkin™, el EpiDerm™ SIT (EPI-200) y el SkinEthic™ RhE (26) (27) (28). La realización de los ensayos debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

Componentes del método de ensayo EhR

Condiciones generales

16. Para reconstruir el epitelio deben utilizarse queratinocitos humanos no transformados. Bajo un estrato córneo funcional, deben encontrarse varias capas de células epiteliales viables (capa basal, capa espinosa, capa granulosa). El estrato córneo debe constar de varias capas con el perfil lipídico necesario para constituir una barrera funcional con la suficiente resistencia contra la penetración rápida de marcadores citotóxicos como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (DSS) o tritón X-100. La existencia de la función de barrera debe demostrarse, y puede evaluarse determinando la concentración a la que el marcador reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI_{50}) tras un tiempo fijo de exposición, o bien determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % (TE_{50}) tras la aplicación del marcador a una concentración fija especificada. Las propiedades de aislamiento del modelo de EhR deben evitar que pase material del estrato córneo al tejido viable, lo que reduciría la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la piel. El modelo de EhR debe estar exento de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas u hongos.

▼M3

Condiciones funcionales

Viabilidad

17. El ensayo utilizado para determinar la magnitud de la viabilidad es el del MTT (25). Los usuarios del modelo de EhR deben asegurarse de que cada lote utilizado de este modelo cumple los criterios definidos en relación con el control negativo (CN). La densidad óptica (DO) del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente reducida, es decir, DO < 0,1. El diseñador o proveedor del modelo de EhR establece un rango de aceptabilidad (con un límite inferior y un límite superior) de los valores de DO de los controles negativos (en las condiciones del método de ensayo de irritación cutánea), y en el cuadro 2 se indican los rangos de aceptabilidad de los tres métodos validados. Hay que demostrar documentalmente que los tejidos tratados con el CN son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la viabilidad) durante todo el tiempo de exposición del ensayo.

Cuadro 2

Rangos de aceptabilidad de los valores de DO de los controles negativos

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Función de barrera

18. El estrato córneo y su composición lipídica deben ser suficientes para impedir la penetración rápida de determinados marcadores citotóxicos (por ejemplo, DSS o tritón X-100), evaluada mediante la CI_{50} o el TE_{50} (véase el cuadro 3).

Morfología

19. Debe efectuarse un examen histológico del modelo de EhR que demuestre una estructura similar a la de la epidermis humana (incluido un estrato córneo de varias capas).

Reproducibilidad

20. Los resultados de los controles positivos (CP) y negativos (CN) del método de ensayo deben demostrar su reproducibilidad a lo largo del tiempo.

Control de calidad (CC)

21. El diseñador o proveedor del modelo de EhR debe velar por que cada lote utilizado de este modelo cumpla los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la *viabilidad* (punto 17), a la *función de barrera* (punto 18) y a la *morfología* (punto 19), y debe demostrar dicho cumplimiento. Estos datos deben proporcionarse a los usuarios del método, de manera que puedan incluirlos en el informe del ensayo. El diseñador o proveedor del modelo de EhR (o el investigador en caso de utilización de un modelo del propio laboratorio) debe establecer un rango de aceptabilidad (con límites superior e inferior) de la CI_{50} o del TE_{50}. Para conseguir una predicción fiable de la clasificación en cuanto al efecto irritante, solo pueden aceptarse los resultados obtenidos con tejidos adecuados. En el cuadro 3 se dan, como ejemplo, los rangos de aceptabilidad de los tres métodos validados.

▼M3

Cuadro 3

Ejemplos de criterios de control de calidad para la aprobación de un lote

	Límite inferior de aceptación	Límite superior de aceptación
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamiento con DSS) (26)	CI_{50} = 1,0 mg/ml	CI_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (tritón X-100 al 1 %) (27)	TE_{50} = 4,8 h	TE_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (tritón X-100 al 1 %) (28)	TE_{50} = 4,0 h	TE_{50} = 9,0 h

Aplicación de las sustancias problema y de control

22. En cada tanda deben utilizarse al menos tres réplicas para cada sustancia problema y cada control. En caso de sustancias líquidas, así como sólidas, debe aplicarse una cantidad de sustancia problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie de la epidermis pero evitando una dosis excesiva, es decir, un mínimo de 25 $\mu L/cm^2$ o 25 mg/cm^2. En caso de sustancias sólidas, antes de aplicarlas debe humedecerse la superficie de la epidermis con agua desionizada o destilada, para mejorar el contacto de dicha superficie con la sustancia problema. Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. Al final del período de exposición, la sustancia problema debe retirarse cuidadosamente de la superficie de la epidermis lavando con una solución amortiguadora acuosa o con NaCl al 0,9 %. En función de cuál de los tres métodos validados de EhR se utilice, el tiempo de exposición varía entre 15 y 60 minutos, y la temperatura de incubación entre 20 y 37 °C. Estos tiempos de exposición y temperaturas se optimizan para cada método de EhR y representan las distintas propiedades intrínsecas de los métodos; puede obtenerse información más detallada en los procedimientos de trabajo normalizados correspondientes a los métodos (26) (27) (28).

23. En cada tanda deben utilizarse controles negativos (CN) y positivos (CP) en paralelo para demostrar que la viabilidad (con el CN), la función de barrera y la sensibilidad tisular resultante (con el CP) de los tejidos se encuentran dentro de un rango histórico de aceptación definido. Como CP se sugiere una solución acuosa de DSS al 5 %. Como CN se sugiere agua o una solución salina amortiguadora de fosfato (PBS).

Medición de la viabilidad celular

24. El elemento más importante del procedimiento de ensayo consiste en que las mediciones de la viabilidad no se realicen inmediatamente después de la exposición a las sustancias problema, sino después de un período de incubación de los tejidos lavados, en medio fresco, durante un tiempo suficiente tras el tratamiento. Este período permite tanto la recuperación de los eventuales efectos citotóxicos débiles como la aparición de efectos citotóxicos claros. En la fase de optimización del ensayo (11) (12) (13) (14) (15) se demostró que la duración óptima del período de incubación tras el tratamiento es de 42 horas.

25. El ensayo del MTT es un método cuantitativo validado que debe utilizarse para medir la viabilidad celular según el presente ME. Es compatible con el uso de un modelo de tejido tridimensional. La muestra de tejido se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (por ejemplo, de 0,3 a 1 mg/mL) durante 3 horas. A continuación, utilizando un disolvente (por ejemplo, isopropanol, isopropanol ácido), se extrae del tejido el precipitado que se produce de formazano azul y se mide la concentración de este determinando la DO a 570 nm, con un paso de banda máximo de ± 30 nm.

▼M3

26. Las propiedades ópticas de la sustancia problema o su acción química sobre el MTT pueden interferir con el ensayo y llevar a una estimación errónea de la viabilidad (debido a que la sustancia problema puede impedir o invertir la formación de color, así como provocarla). Puede ocurrir así cuando una sustancia problema determinada no se elimina completamente del tejido por el lavado o cuando penetra en la epidermis. Si la sustancia problema actúa directamente sobre el MTT (es un reductor de este), tiene color natural o se colorea durante el tratamiento del tejido, deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir la posible interferencia de la sustancia problema con la técnica de medición de la viabilidad. En los procedimientos de trabajo normalizados correspondientes a los tres métodos validados puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (26) (27) (28).

Criterios de aceptabilidad

27. En cada método en que se utilicen lotes válidos de modelos de EhR (véase el punto 21), los tejidos tratados con el CN deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos que hayan pasado por las fases de transporte y recepción y por todos los procesos del protocolo. Los valores de DO del control no deben ser inferiores a los límites históricamente establecidos. Análogamente, los tejidos tratados con el CP, es decir, DSS en solución acuosa al 5 %, deben reflejar su capacidad de responder a una sustancia irritante en las condiciones del ME (26) (27) (28). Deben definirse unas medidas asociadas y adecuadas de la variabilidad entre las réplicas del tejido [por ejemplo, si se utilizan desviaciones típicas (DT), deben estar dentro del intervalo de tolerancia del 95 % unilateral calculado a partir de los datos históricos; en el caso del MVR, la DT es < 18 %].

Interpretación de los resultados y modelo de predicción

28. Los valores de DO obtenidos con cada sustancia problema pueden utilizarse para calcular el porcentaje de viabilidad respecto al CN, que se fija en el 100 %. Es necesario definir claramente y documentar, así como demostrar que son adecuados, el valor de corte del porcentaje de viabilidad celular que permite distinguir las sustancias problema irritantes de las no clasificadas, y el procedimiento o procedimientos estadísticos utilizados para evaluar los resultados e identificar las sustancias irritantes. A continuación se indican los valores de corte para la predicción del efecto irritante:

— se considera que la sustancia problema es irritante para la piel de acuerdo con la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE si la viabilidad del tejido después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es inferior o igual (≤) al 50 %,

— en función del marco normativo en el que se utilicen los resultados del presente ME, la sustancia problema podrá considerarse no irritante para la piel de acuerdo con la categoría «sin categoría» del SGA de la ONU o del CLP de la UE, si la viabilidad del tejido después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es superior (>) al 50 %.

DATOS E INFORME

Datos

29. Respecto a cada tanda, deben recogerse en un cuadro los datos obtenidos con las distintas réplicas de los tejidos (por ejemplo, los valores de DO y los de los porcentajes de viabilidad celular calculados para cada sustancia problema, con la clasificación), incluidos los datos de los experimentos repetidos, en su caso. Además, deben indicarse las medias ± desviación típica de cada tanda. Con respecto a cada sustancia estudiada, deben indicarse las interacciones observadas con el reactivo MTT y las sustancias problema coloreadas.

▼**M3**

Informe del ensayo

30. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancias problema y de control:

— denominación o denominaciones químicas, como nombre y número CAS, o nombre y número CE, si se conocen,

— pureza y composición de la sustancia (en porcentaje del peso),

— propiedades físicas y químicas pertinentes para la realización del estudio (por ejemplo, estado físico, estabilidad, volatilidad, pH e hidrosolubilidad, si se conocen),

— tratamiento de las sustancias problema y de control antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración),

— condiciones de almacenamiento.

Justificación del modelo de EhR y del protocolo utilizados

Condiciones del ensayo:

— sistema celular utilizado,

— información justificativa completa sobre el modelo concreto de EhR utilizado, incluido su comportamiento; debe comprender, entre otras cosas:

  i) la viabilidad,

  ii) la función de barrera,

  iii) la morfología,

  iv) la reproducibilidad y capacidad de predicción,

  v) los controles de calidad del modelo,

— particularidades del procedimiento de ensayo empleado,

— dosis utilizadas en el ensayo, duración de la exposición y del período de incubación tras el tratamiento,

— descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo,

— referencia a datos históricos del modelo; debe comprender, entre otras cosas:

  i) aceptabilidad de los datos de control de calidad con referencia a los datos históricos de los lotes,

  ii) aceptabilidad de los valores de los controles positivos y negativos con referencia a las medias y rangos de los controles positivos y negativos,

— descripción de los criterios de evaluación utilizados, incluida la justificación de la selección de los valores límite del modelo de predicción,

— referencia a los datos históricos del control.

▼M3

Resultados:

— cuadro con los datos individuales de las distintas sustancias problema correspondientes a cada tanda y cada medición con una muestra repetida,

— indicación de los controles utilizados para sustancias problema que son reductores directos del MTT o colorantes,

— descripción de otros efectos observados.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

(1) Naciones Unidas (2009), Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), tercera edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en la dirección: [http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_s.html]

(2) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2009), Statement on the «Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards», issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006. DO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

(4) OCDE (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OCDE (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OCDE (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OCDE (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (EHR)? Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy-Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

(20) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (CEVMA de la Comisión Europea) (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OCDE (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min-42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp. 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava 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, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (DO L 225 de 21.8.2001, p. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal*in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

Apéndice 1

Definiciones

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (9).

Viabilidad celular: Parámetro que mide la actividad total de una población celular como, por ejemplo, la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo], que, según el efecto considerado y el diseño del ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células vivas.

Concordancia: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categórico, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «exactitud» se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todas las sustancias estudiadas que se clasifican correctamente como positivas o negativas (9).

TE_{50}: Puede estimarse determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % tras la administración de la sustancia marcadora a una concentración fija determinada; véase también CI_{50}.

Sistema CLP de la UE [Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas]: Aplica en la Unión Europea (UE) el sistema SGA de la ONU para la clasificación y etiquetado de los productos químicos (sustancias y mezclas) (3).

SGA [(Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos de las Naciones Unidas (ONU)]: Sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, para la salud y para el medio ambiente, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

CI_{50}: Puede estimarse determinando la concentración a la que una sustancia marcadora reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % (CI_{50}) tras un tiempo fijo de exposición; véase también TE_{50}.

Dosis excesiva: Cantidad de sustancia problema aplicada a la epidermis que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie de la epidermis.

Ensayos de imitación: Denominación de un método de ensayo que es estructural y funcionalmente similar a un método de ensayo de referencia, validado y aceptado. Tales métodos de ensayo serían candidatos para una validación de actualización. También se pueden denominar métodos de ensayo similares (9).

Normas de comportamiento (NC): Normas, basadas en un método de ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto, que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo, ii) una lista mínima de sustancias de referencia seleccionadas de entre las sustancias utilizadas para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado, y iii) los niveles similares de exactitud y fiabilidad que, sobre la base de lo obtenido con el método de ensayo validado, debe mostrar el método de ensayo propuesto cuando se evalúa con la lista mínima de sustancias de referencia (9).

▼**M3**

Sustancias de referencia: Sustancias seleccionadas para utilizarse en el proceso de validación, cuyas respuestas en el sistema de ensayo de referencia *in vitro* o *in vivo* o en la especie de interés ya se conocen. Estas sustancias deben ser representativas de las clases de sustancias con las que esté previsto utilizar el método de ensayo, y deben representar toda la gama de respuestas que puede esperarse de las sustancias con las que pueda utilizarse, desde fuertes hasta débiles e incluso negativas. Es posible que se necesiten distintos conjuntos de sustancias de referencia para las diferentes fases del proceso de validación y para los distintos métodos de ensayo y usos de los ensayos (9).

Pertinencia: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (9).

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (9).

Ensayo de sustitución: Ensayo que se diseña para sustituir un ensayo utilizado de forma sistemática y aceptado para la identificación del peligro o la evaluación del riesgo, y del que se ha determinado que proporciona una protección equivalente o mejorada de la salud humana o del medio ambiente, según corresponda, respecto al ensayo aceptado, en relación con todas las situaciones de ensayo y todas las sustancias posibles (9).

Sensibilidad: Proporción de todas las sustancias positivas o activas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categóricos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Irritación cutánea: Producción de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema durante un período de hasta 4 horas. La irritación cutánea es una reacción no inmunogénica que se presenta localmente y aparece poco tiempo después de la estimulación (29). Su característica principal es consistir en un proceso reversible con la presencia de reacciones inflamatorias y la mayoría de los signos clínicos característicos de la irritación (eritema, edema, prurito y dolor) en relación con un proceso inflamatorio.

Especificidad: Proporción de todas las sustancias negativas o inactivas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categóricos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

Estrategia de ensayos secuenciales: Utilización de métodos de ensayo de manera secuencial; los métodos de ensayo seleccionados en cada nivel sucesivo se deciden sobre la base de los resultados del nivel anterior de ensayos (9).

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

▼M3

Apéndice 2

Normas de comportamiento para la evaluación de métodos de epidermis humana reconstruida (EhR) similares o modificados que se propongan para determinar la irritación cutánea

INTRODUCCIÓN

1. El objetivo de las normas de comportamiento (NC) consiste en comunicar la base por la que puede determinarse si un nuevo método, tanto protegido (es decir, sujeto a derechos de autor, patentado, registrado) como no protegido, presenta la suficiente exactitud y fiabilidad para determinados fines de ensayo. Estas normas de comportamiento, basadas en métodos validados y aceptados, pueden utilizarse para evaluar la fiabilidad y la exactitud de otros métodos similares (conocidos como ensayos «de imitación») que se basan en principios científicos similares y miden o predicen el mismo efecto biológico o tóxico (9).

2. Antes de la adopción de métodos modificados (es decir, posibles mejoras propuestas para un método aprobado), debe efectuarse una evaluación para determinar el efecto que tienen los cambios propuestos sobre el comportamiento del ensayo y la medida en que tales cambios afectan a la información disponible para los demás componentes del proceso de validación. En función del número y de la naturaleza de los cambios propuestos, de los datos generados y de la documentación justificativa de tales cambios, estos métodos deben someterse o bien al mismo proceso de validación descrito para un nuevo ensayo o bien, si procede, a una evaluación limitada de la fiabilidad y de la pertinencia utilizando normas de comportamiento establecidas (9).

3. Los métodos similares o modificados respecto a cualquiera de los tres métodos validados [EpiSkin™ (método validado de referencia– MVR), EpiDerm™ SIT (EPI-200) y SkinEthic™ RHE] propuestos para utilizarse con arreglo al presente ME deben evaluarse a fin de determinar su fiabilidad y exactitud, utilizando sustancias representativas de toda la gama de puntuaciones de la prueba de irritación de Draize. Los métodos similares o modificados propuestos, cuando se evalúan con las veinte sustancias de referencia recomendadas de las normas de comportamiento (cuadro 1), deben presentar unos valores de fiabilidad y exactitud comparables a los del MVR o mejores que estos (cuadro 2) (2) (16). Los valores de fiabilidad y exactitud que deben alcanzarse se presentan en los puntos 8 a 12 del presente apéndice. Se incluyen sustancias no clasificadas («sin categoría» según el SGA de la ONU o el CLP de la UE) y clasificadas (categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE) (1), que representan diferentes clases químicas, de forma que la fiabilidad y la exactitud (sensibilidad, especificidad y exactitud general) del método propuesto puedan compararse con las del MVR. Antes de utilizar un método para ensayar nuevas sustancias problema, debe determinarse su fiabilidad, así como su capacidad para detectar correctamente las sustancias irritantes de la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE, y, en función del marco normativo para el que se obtienen los datos, también su capacidad para detectar correctamente las sustancias «sin categoría» según el SGA de la ONU o el CLP de la UE.

4. Estas NC se basan en las NC del CEVMA de la Comisión Europea (8), actualizadas de acuerdo con los sistemas de clasificación y etiquetado SGA de la ONU y CLP de la UE (1) (3). Las NC originales se definieron tras la realización del estudio de validación (21) y se basaban en el sistema de clasificación de la UE establecido en la Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava 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, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas ([1]). Debido a la adopción del sistema SGA de clasificación y etiquetado

([1]) DO L 225 de 21.8.2001, p. 1.

▼M3

de la ONU en la UE (sistema CLP de la UE) (3), que tuvo lugar entre la finalización del estudio de validación y la elaboración del presente ME, las NC se han actualizado (8). Esta actualización consiste en cambios que se refieren principalmente: i) al conjunto de sustancias de referencia de las NC, y ii) a los valores definidos de fiabilidad y exactitud (2) (23).

NORMAS DE COMPORTAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO *IN VITRO* CON EHR PARA DETERMINAR LA IRRITACIÓN CUTÁNEA

5. Las NC comprenden los tres elementos siguientes (9):

I) Componentes fundamentales del método de ensayo;

II) Lista mínima de sustancias de referencia;

III) Valores definidos de exactitud y fiabilidad.

I) **Componentes fundamentales del método de ensayo**

6. Consisten en los elementos fundamentales de carácter estructural, funcional y de procedimiento de un método validado que deben incluirse en el protocolo de un método propuesto modificado o similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Estos componentes incluyen características únicas del método, aspectos críticos del procedimiento y medidas de control de calidad. El mantenimiento de los componentes fundamentales del método de ensayo contribuye a garantizar que un método propuesto modificado o similar se basa en los mismos conceptos que el MVR correspondiente (9). Los componentes fundamentales del método de ensayo se describen con detalle en los puntos 16 a 21 del ME y los ensayos deben realizarse atendiendo a los siguientes aspectos:

— Condiciones generales (punto 16)

— Condiciones funcionales, que incluyen:

— viabilidad (punto 17),

— función de barrera (punto 18),

— morfología (punto 19),

— reproducibilidad (punto 20), y

— control de calidad (punto 21).

II) **Lista mínima de sustancias de referencia**

7. Las sustancias de referencia se utilizan para determinar si la fiabilidad y la exactitud de un método propuesto similar o modificado, del que se haya demostrado que presenta una similitud al MVR suficiente desde el punto de vista estructural y funcional, o que represente una modificación poco importante de uno de los tres métodos validados, son comparables a las del MVR o mejores que estas (2) (8) (16) (23). Entre las veinte sustancias de referencia recomendadas que figuran en el cuadro 1 se encuentran sustancias representativas de diferentes clases químicas (es decir, categorías químicas basadas en grupos funcionales) y de toda la gama de puntuaciones de la prueba de irritación de Draize (desde no irritantes hasta muy irritantes). Las sustancias incluidas en esta lista comprenden diez sustancias de la categoría 2 del SGA de la ONU o del CLP de la UE, y otras diez sustancias

▼M3

sin categoría, de las que tres son sustancias de la categoría optativa 3 del SGA de la ONU. Según el presente método de ensayo, la categoría optativa 3 no se considera categoría («sin categoría»). Las sustancias recogidas en el cuadro 1 se han elegido entre las sustancias utilizadas en la fase de optimización tras la prevalidación y en el estudio de validación del MVR, teniendo en cuenta los grupos funcionales químicos y el estado físico (14) (18). Estas sustancias de referencia representan el número mínimo de sustancias que deben utilizarse para evaluar la exactitud y la fiabilidad de un método propuesto similar o modificado, pero no deben utilizarse para el desarrollo de nuevos métodos. En situaciones en que no se disponga de alguna sustancia de la lista, se podrán utilizar otras sustancias para las que se disponga de datos de referencia *in vivo* adecuados, en principio del grupo de sustancias utilizadas en la fase de optimización tras la prevalidación o en el estudio de validación del MVR. Si así se desea, esta lista mínima de sustancias de referencia puede complementarse con sustancias adicionales representativas de otras clases químicas y para las que se disponga de datos de referencia *in vivo* adecuados, con el fin de evaluar mejor la exactitud del método propuesto.

Cuadro 1

Lista mínima de sustancias de referencia para la determinación de los valores de exactitud y fiabilidad de los métodos similares o modificados de irritación cutánea con EhR ([1])

Sustancia	Número CAS	Estado físico	Puntuación *in vivo*	Cat. MVR *in vitro*	Cat. SGA de la ONU o CLP de la UE *in vivo*
1-Bromo-4-clorobutano	6940-78-9	Líquido	0	Cat. 2	Sin categoría
Ftalato de dietilo	84-66-2	Líquido	0	Sin categoría	Sin categoría
Ácido naftaleno-acético	86-87-3	Sólido	0	Sin categoría	Sin categoría
Fenoxiacetato de alilo	7493-74-5	Líquido	0,3	Sin categoría	Sin categoría
Isopropanol	67-63-0	Líquido	0,3	Sin categoría	Sin categoría
4-Metil-tio-benzaldehído	3446-89-7	Líquido	1	Cat. 2	Sin categoría
Estearato de metilo	112-61-8	Sólido	1	Sin categoría	Sin categoría
Butirato de heptilo	5870-93-9	Líquido	1,7	Sin categoría	Sin categoría
Salicilato de hexilo	6259-76-3	Líquido	2	Sin categoría	Sin categoría
Cinamaldehído	104-55-2	Líquido	2	Cat. 2	Sin categoría *(Categoría optativa 3)* ([3])
1-decanol ([2])	*112-30-1*	*Líquido*	*2,3*	*Cat. 2*	*Cat. 2*
Aldehído ciclámico	103-95-7	Líquido	2,3	Cat. 2	Cat. 2
1-Bromohexano	111-25-1	Líquido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
Clorhidrato de 2-clorometil-3,5-dimetil-4-metoxipiridina	86604-75-3	Sólido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
Disulfuro de di-n-propilo ([2])	*629-19-6*	*Líquido*	*3*	*Sin categoría*	*Cat. 2*
Hidróxido de potasio (solución acuosa al 5 %)	1310-58-3	Líquido	3	Cat. 2	Cat. 2
5-(1,1-Dimetiletil)-2-metil-bencenotiol	7340-90-1	Líquido	3,3	Cat. 2	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	Sólido	3,3	Cat. 2	Cat. 2

▼M3

Sustancia	Número CAS	Estado físico	Puntuación *in vivo*	Cat. MVR *in vitro*	Cat. SGA de la ONU o CLP de la UE *in vivo*
Heptanal	111-71-7	Líquido	3,4	Cat. 2	Cat. 2
Tetracloroetileno	127-18-4	Líquido	4	Cat. 2	Cat. 2

([1]) La elección de las sustancias se basa en los criterios siguientes: i) las sustancias se encuentran en el comercio, ii) son representativas de toda la gama de puntuaciones de la prueba de irritación de Draize (desde no irritantes hasta muy irritantes), iii) tienen una estructura química bien definida; iv) son representativas de los grupos funcionales químicos utilizados en el proceso de validación, y v) no están asociadas con un perfil extremadamente tóxico (por ejemplo, carcinogénesis o toxicidad para el sistema reproductor) ni con unos costes de eliminación prohibitivos.

([2]) Sustancias que son irritantes en conejos pero para las que existen pruebas fiables de que no son irritantes en seres humanos (31) (32) (33).

([3]) Con arreglo al SGA de la ONU, pero no en el CLP de la UE.

III) **Valores definidos de exactitud y fiabilidad**

8. A efectos de establecer la fiabilidad y pertinencia de métodos propuestos similares o modificados que se vayan a transferir entre laboratorios, es necesario ensayar la totalidad de las veinte sustancias de referencia del cuadro 1 en, al menos, tres laboratorios. Sin embargo, si el método propuesto se va a utilizar en un único laboratorio, no es necesario para la validación hacer el ensayo multilaboratorios. Sin embargo, es fundamental que tales estudios de validación sean evaluados independientemente por órganos de validación reconocidos internacionalmente, de acuerdo con directrices internacionales (9). En cada laboratorio, debe someterse a ensayo la totalidad de las veinte sustancias de referencia, en tres tandas independientes, realizadas con diferentes lotes del tejido y a intervalos suficientemente separados. Cada tanda debe consistir como mínimo en tres réplicas del tejido ensayadas en paralelo con cada sustancia problema, el CN y el CP.

9. El cálculo de los valores de fiabilidad y exactitud del método propuesto debe efectuarse atendiendo a la totalidad de los cuatro criterios recogidos a continuación, velando por que los valores de fiabilidad y pertinencia se calculen de forma coherente y definida con anterioridad:

   1. Para el cálculo de la variabilidad intra e interlaboratorios y de la capacidad de predicción (exactitud) del método se tendrán en cuenta únicamente los datos procedentes de secuencias de tandas completas.

   2. La clasificación final de cada sustancia de referencia en cada laboratorio participante debe obtenerse utilizando el valor medio de la viabilidad de las distintas tandas realizadas en una secuencia de tandas completa.

   3. Para el cálculo de la variabilidad interlaboratorios del método se tendrán en cuenta únicamente los datos obtenidos con sustancias que se hayan sometido a secuencias de tandas completas en todos los laboratorios participantes.

   4. El cálculo de los valores de exactitud se efectuará sobre la base de las predicciones individuales de los laboratorios obtenidas para las veinte sustancias de referencia por los distintos laboratorios participantes.

   En este contexto, una **secuencia de tandas** consiste en tres tandas independientes realizadas en un laboratorio con una sustancia problema. Una **secuencia de tandas completa** es una secuencia de tandas realizadas en un laboratorio con una sustancia problema cuando las tres tandas son válidas. Esto significa que una sola tanda inválida anula la validez de toda una secuencia de tres tandas.

Reproducibilidad intralaboratorios

10. La evaluación de la reproducibilidad intralaboratorios debe indicar que la concordancia de las clasificaciones (categoría 2 y «sin categoría» del SGA de la ONU o del CLP de la UE) obtenidas en tandas de ensayo diferentes e independientes, con las veinte sustancias de referencia, dentro de un mismo laboratorio, es igual o superior (≥) al 90 %.

▼M3

Reproducibilidad interlaboratorios

11. Si el método propuesto se va a utilizar solamente en un laboratorio, no es fundamental evaluar la reproducibilidad interlaboratorios. En caso de que el método se vaya a transferir entre laboratorios, la concordancia de las clasificaciones (categoría 2 y «sin categoría» del SGA de la ONU o del CLP de la UE) obtenidas en tandas de ensayo diferentes e independientes, con las veinte sustancias de referencia, entre preferentemente un mínimo de tres laboratorios, debe ser igual o superior (≥) al 80 %.

Capacidad de predicción (exactitud)

12. La exactitud (sensibilidad, especificidad y exactitud general) del método propuesto similar o modificado debe ser comparable a la del MVR o mejor que esta, teniendo en cuenta la información adicional relativa a la pertinencia en la especie de interés (cuadro 2). La sensibilidad debe ser igual o superior (≥) al 80 % (2) (8) (23). Sin embargo, se aplica otra restricción específica a la sensibilidad del método *in vitro* propuesto, ya que solamente dos sustancias de la categoría 2 *in vivo,* el 1-decanol y el disulfuro de di-n-propilo, pueden ser clasificados erróneamente como «sin categoría» por más de un laboratorio participante. La especificidad debe ser igual o superior (≥) al 70 % (2) (8) (23). No hay ninguna otra restricción respecto a la especificidad del método *in vitro* propuesto, es decir, cualquier laboratorio participante puede clasificar erróneamente cualquier sustancia «sin categoría»*in vivo* siempre que la especificidad final del método de ensayo se mantenga dentro del rango aceptable. La exactitud general debe ser igual o superior (≥) al 75 % (2) (8) (23). Aunque la sensibilidad del MVR calculada con las veinte sustancias de referencia recogidas en el cuadro 1 sea igual al 90 %, el valor mínimo definido de sensibilidad que se exige para que un método similar o modificado se considere válido está fijado en el 80 %, ya que se sabe que tanto el 1-decanol (sustancia dudosa) como el disulfuro de di-n-propilo (falso negativo en el MVR) no son irritantes para los seres humanos (31) (32) (33), aunque estén identificados como irritantes en la prueba con conejos. Como los modelos de EhR están basados en células de origen humano, es posible que clasifiquen estas sustancias como no irritantes («sin categoría» según el SGA de la ONU o el CLP de la UE).

Cuadro 2

Valores requeridos de capacidad de predicción en cuanto a la sensibilidad, especificidad y exactitud general para que un método similar o modificado se considere válido

Sensibilidad	Especificidad	Exactitud general
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Criterios de aceptación del estudio

13. Es posible que uno o varios de los ensayos correspondientes a una o más sustancias problema no cumplan los criterios de aceptación del ensayo en cuanto a las sustancias problema y de control, o no sean aceptables por otros motivos. Para completar los datos que falten respecto a cada sustancia problema se puede efectuar un máximo de dos ensayos adicionales (repeticiones del ensayo). Más precisamente, como en caso de repetición del ensayo también hay que ensayar en paralelo el CP y el CN, puede realizarse un máximo de dos tandas adicionales para cada sustancia problema.

14. No hay que descartar que, incluso después de repetir el ensayo, no se obtenga el número mínimo de tres tandas válidas requerido para cada sustancia estudiada en relación con cada sustancia de referencia en cada uno de los laboratorios participantes, lo que dejaría incompleto el cuadro de datos. En tales casos, deben cumplirse los siguientes tres criterios conjuntamente para poder considerar aceptables los conjuntos de datos:

    1. Cada una de las veinte sustancias de referencia debe tener al menos una secuencia de tandas completa.

▼**M3**

2. En cada uno de los, como mínimo, tres laboratorios participantes, debe completarse un mínimo del 85 % de las secuencias de tandas (con veinte sustancias, esto significa que en un mismo laboratorio se pueden producir tres secuencias de tandas inválidas).

3. Es necesario que se complete como mínimo el 90 % de todas las posibles secuencias de tandas de los, como mínimo, tres laboratorios (con veinte sustancias ensayadas en tres laboratorios, esto equivale a permitir un total de seis secuencias de tandas inválidas).

▼M2

B. 47. MÉTODO DE ENSAYO DE LA OPACIDAD Y PERMEABILIDAD DE LA CÓRNEA DE BOVINO PARA DETECTAR AGENTES CORROSIVOS E IRRITANTES INTENSOS PARA LOS OJOS

INTRODUCCIÓN

1. El método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) es un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse, en ciertas circunstancias y con limitaciones específicas, para clasificar sustancias y mezclas como «agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos» (1) (2) (3). A efectos de este método de ensayo, se entiende por «agentes irritantes intensos» aquellos que inducen lesiones oculares que persisten en el conejo durante al menos 21 días tras su administración. Aunque no se considera válido para sustituir completamente al ensayo *in vivo* en ojo de conejo, se recomienda utilizar el BCOP como parte de una estrategia de ensayo gradual para la clasificación normativa y el etiquetado dentro de un ámbito específico de aplicabilidad (4) (5). Las sustancias y mezclas problema (6) pueden clasificarse como agentes corrosivos o irritantes intensos sin necesidad de efectuar más pruebas con conejos. Las sustancias que den resultado negativo tendrían que someterse a ensayo con conejos siguiendo una estrategia de ensayo secuencial, como se describe en las Directrices de ensayo 405 de la OCDE (7) (método B. 5 del presente anexo).

2. El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar la posible corrosividad o capacidad de irritación intensa para los ojos de una sustancia problema en función de su capacidad para inducir opacidad y aumento de la permeabilidad en una córnea aislada de bovino. Los efectos tóxicos para la córnea se miden mediante a) el descenso de la transmisión luminosa (opacidad) y b) el aumento del paso del pigmento fluoresceína sódica (permeabilidad). Los resultados de la evaluación de la opacidad y de la permeabilidad de la córnea tras su exposición a la sustancia problema se combinan para obtener una puntuación de la capacidad de irritación *in vitro* (conocida por sus siglas en inglés, IVIS), que se utiliza para clasificar el nivel de capacidad de irritación de la sustancia problema.

3. También se han ensayado utilizando el método de ensayo BCOP agentes irritantes oculares que provocan lesiones que desaparecen en menos de 21 días, así como sustancias no irritantes. Sin embargo, no se han evaluado oficialmente la exactitud ni la fiabilidad del método de ensayo BCOP respecto a las sustancias de estas categorías.

4. En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

5. El presente método de ensayo se basa en el protocolo del método de ensayo BCOP del Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos estadounidense (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (8), elaborado siguiendo un estudio de validación internacional (4) (5) (9), con aportaciones del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) y del Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM). El protocolo se basa en información obtenida del Protocolo 124 del Institute for In Vitro Sciences (IIVS) e INVITTOX (10), que representa el protocolo utilizado en el estudio de prevalidación del ensayo BCOP, financiado por la Comunidad Europea y realizado en 1997-1998. Ambos protocolos se basan en la metodología del ensayo BCOP comunicada por primera vez por Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Las limitaciones que se han detectado en este método de ensayo están relacionadas con la elevada tasa de falsos resultados positivos de alcoholes y cetonas y la elevada tasa de falsos resultados negativos de sólidos, observadas en la base de datos de validación (véase el punto 44) (5). Si se excluyen de la base de datos las sustancias de estas clases químicas y físicas, mejora sustancialmente la exactitud del ensayo BCOP en los sistemas de clasificación de la UE, EPA y SGA (5). Teniendo en cuenta el objeto de este ensayo (es decir, tan solo identificar agentes corrosivos o irritantes intensos para los ojos), no importa que sean elevadas las tasas de falsos resultados negativos, ya que las sustancias correspondientes se someterían posteriormente a ensayo con conejos o a otros ensayos *in vitro* validados adecuadamente, en función de las exigencias normativas, utilizando una estrategia de ensayo secuencial en un enfoque de ponderación de los datos. Por otra parte, la actual base de datos de validación no permite una evaluación adecuada de algunas clases de sustancias o productos (por ejemplo, mezclas). Sin embargo, los investigadores pueden considerar la posibilidad de utilizar este método de ensayo con todos los tipos de material problema (incluidas las mezclas), con lo cual un resultado positivo podría aceptarse como indicación de una respuesta corrosiva o irritante intensa para los ojos. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos con alcoholes o cetonas deben interpretarse con precaución, debido al riesgo de sobrepredicción.

7. Todos los procedimientos con ojos de bovino y córneas de bovino deben ajustarse a las normas y procedimientos aplicables de la instalación de ensayo en relación con la manipulación de materiales derivados de animales, entre los que figuran los tejidos o los líquidos intersticiales. Se recomienda observar las precauciones universales de laboratorio (12).

8. Una de las limitaciones del método de ensayo consiste en que, a pesar de que tiene en cuenta algunos de los efectos oculares evaluados con el método de ensayo de la capacidad de irritación ocular en el conejo y, hasta cierto punto, su gravedad, no atiende a las lesiones de la conjuntiva ni del iris. Asimismo, aunque la reversibilidad de las lesiones de la córnea no puede evaluarse *per se* en el ensayo BCOP, se ha propuesto, sobre la base de los estudios en ojo de conejo, que la evaluación de la profundidad inicial de la lesión de la córnea puede utilizarse para distinguir entre efectos reversibles e irreversibles (13). Finalmente, el BCOP no permite la evaluación del potencial de toxicidad sistémica asociado con la exposición ocular.

9. Se está trabajando actualmente para seguir caracterizando la utilidad y las limitaciones del ensayo BCOP para detectar los agentes irritantes no intensos y los agentes no irritantes (véase también el punto 45). También se anima a los usuarios a presentar muestras o datos a las organizaciones de validación para una evaluación oficial de posibles usos futuros del método de ensayo BCOP, incluida la detección de agentes irritantes no intensos y agentes no irritantes.

10. Cuando algún laboratorio establezca inicialmente este ensayo, deben utilizarse las sustancias para demostrar la aptitud que se indican en el apéndice 2. Los laboratorios pueden utilizar estas sustancias para demostrar su competencia técnica en la realización del método de ensayo BCOP antes de presentar, con fines de clasificación normativa de peligros, los datos obtenidos con este ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El método de ensayo BCOP es un modelo organotípico con mantenimiento a corto plazo del funcionamiento fisiológico y bioquímico normal de la córnea de bovino *in vitro*. En este método de ensayo, la lesión provocada por la sustancia problema se evalúa mediante la medición cuantitativa de los cambios producidos en la opacidad y en la permeabilidad de la córnea, utilizando un opacímetro y un espectrofotómetro de luz visible, respectivamente. Las dos mediciones se combinan para calcular la IVIS, que se utiliza para asignar una categoría de clasificación de peligro por irritación *in vitro* a fin de predecir el potencial de irritación ocular *in vivo* de una sustancia problema (véanse los criterios de decisión).

▼M2

12. El método de ensayo BCOP utiliza córneas aisladas de ojos de ganado bovino recién sacrificado. La opacidad de la córnea se mide cuantitativamente como cantidad de luz transmitida a través de la córnea. La permeabilidad se mide cuantitativamente como cantidad del pigmento fluoresceína sódica que atraviesa todo el espesor de la córnea y se detecta así en el medio que se encuentra en la cámara posterior. Las sustancias problema se aplican a la superficie epitelial de la córnea poniéndolas en la cámara anterior del soporte de córnea. En el apéndice 3 se ofrece una descripción y un diagrama de un soporte de córnea utilizado en el BCOP. Los soportes de córnea pueden obtenerse de diferentes fuentes comerciales o bien construirse en el propio laboratorio.

Fuente y edad de los ojos de bovino y selección de la especie animal

13. El ganado bovino enviado a los mataderos se sacrifica normalmente para el consumo humano o con otros fines comerciales. Como fuente de córneas para el BCOP se utilizan solo animales sanos que se consideren adecuados para entrar en la cadena alimentaria humana. Debido a que el ganado bovino presenta una amplia variedad de peso, en función de la raza, edad y sexo, no se recomienda ningún peso concreto del animal en el momento del sacrificio.

14. Puede variar el tamaño de la córnea cuando se utilizan ojos de animales de distintas edades. Las córneas con un diámetro horizontal > 30,5 mm y un espesor central de la córnea (ECC) ≥ 1 100 μm suelen obtenerse de animales de más de ocho años, mientras que las córneas con un diámetro horizontal < 28,5 mm y un ECC < 900 μm suelen proceder de animales de menos de cinco años (14). Por este motivo, no suelen utilizarse ojos de animales de más de sesenta meses de edad. Tradicionalmente no se utilizan tampoco ojos de animales de menos de doce meses, ya que estos ojos están aún en fase de desarrollo y el espesor y el diámetro de su córnea son considerablemente más pequeños que los observados en ojos de bovinos adultos. Sin embargo, es admisible el uso de córneas de animales jóvenes (es decir, de entre seis y doce meses de edad) porque presentan ciertas ventajas, como una mayor disponibilidad, una variabilidad pequeña en cuanto a la edad, y un peligro reducido en cuanto a la posible exposición de los trabajadores a la encefalopatía espongiforme bovina (15). Como puede ser útil una evaluación más completa del efecto del tamaño o del espesor de la córnea sobre la sensibilidad ante sustancias corrosivas e irritantes, se anima a los usuarios a informar sobre la edad o el peso estimados de los animales de los que proceden las córneas utilizadas en un estudio.

Recogida y transporte de los ojos al laboratorio

15. Los ojos son recogidos por los empleados del matadero. Para minimizar las lesiones mecánicas o de otro tipo que pueden sufrir los ojos, estos deben enuclearse lo antes posible tras la muerte. A fin de evitar la exposición de los ojos a sustancias potencialmente irritantes, los empleados del matadero no deben utilizar detergentes cuando laven la cabeza del animal.

16. Los ojos deben sumergirse completamente en solución salina equilibrada de Hank (conocida por sus siglas en inglés, HBSS) en un recipiente de tamaño adecuado, y transportarse al laboratorio de manera que se reduzcan al mínimo su deterioro y su contaminación bacteriana. Como los ojos se recogen durante el proceso de sacrificio, pueden estar expuestos a la sangre y a otras sustancias biológicas, además de bacterias y otros microorganismos. Por tanto, es importante garantizar que se reduce al mínimo el riesgo de contaminación (por ejemplo, manteniendo en hielo el recipiente con los ojos o añadiendo antibióticos a la HBSS utilizada para conservar los ojos durante el transporte [por ejemplo, 100 UI/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomicina]).

▼M2

17. Debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la recogida de los ojos y la utilización de las córneas en el BCOP (lo normal es efectuar todo el proceso en un solo día), y hay que demostrar que ese tiempo no altera los resultados del ensayo. Estos resultados se basan en los criterios de selección de los ojos, así como en las respuestas obtenidas con controles positivos y negativos. Todos los ojos utilizados en el ensayo deben proceder del mismo grupo de ojos recogidos un día concreto.

Criterios de selección de los ojos utilizados en el BCOP

18. Tras su llegada al laboratorio, los ojos se someten a un atento examen para detectar posibles defectos, como un aumento de la opacidad, arañazos o neovascularización. Solo deben utilizarse las córneas de ojos que no presenten estos defectos.

19. La calidad de cada córnea se evalúa también en otras fases posteriores del ensayo. Se deben rechazar las córneas que, tras un periodo inicial de estabilización de una hora, tengan una opacidad de más de siete unidades de opacidad (nota: el opacímetro debe calibrarse con los patrones de opacidad utilizados para establecer las unidades de opacidad; véase el apéndice 3).

20. Cada grupo de tratamiento (sustancia problema, controles negativos y positivos simultáneos) consiste en un mínimo de tres ojos. Para el control negativo en el ensayo BCPO deben utilizarse tres córneas. Puesto que todas las córneas se extraen del globo entero y se montan en las cámaras de córnea, existe la posibilidad de que haya artefactos procedentes de la manipulación que influyan en los distintos valores de opacidad y permeabilidad de la córnea (incluido el control negativo). Por otra parte, los valores de opacidad y permeabilidad de las córneas de control negativo se utilizan para corregir los valores de opacidad y permeabilidad de las córneas tratadas con la muestra problema y con los controles positivos a efectos del cálculo de la IVIS.

PROCEDIMIENTO

Preparación de los ojos

21. Se disecan córneas libres de defectos, a las que les queda un borde de 2 o 3 mm de esclerótica para facilitar la manipulación posterior, atendiendo a no lesionar el epitelio ni el endotelio de la córnea. Las córneas aisladas se montan en soportes de córnea, diseñados especialmente, que consisten en un compartimento anterior y otro posterior, en contacto respectivamente con el lado epitelial y el lado endotelial de la córnea. Ambas cámaras se llenan hasta rebosar con medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) precalentado, empezando por la cámara posterior y evitando la formación de burbujas. El dispositivo se estabiliza después a 32 ± 1 °C durante al menos una hora para que las córneas alcancen un estado de equilibrio con el medio y consigan una actividad metabólica normal, dentro de lo posible (la temperatura aproximada de la superficie de la córnea *in vivo* es de 32 °C).

22. Tras el periodo de estabilización, se añade a ambas cámaras nuevo EMEM precalentado y se toman lecturas de la opacidad de base de cada córnea. Deben desecharse las córneas que muestren lesiones tisulares macroscópicas (por ejemplo, arañazos, pigmentación, neovascularización) o una opacidad de más de siete unidades de opacidad. Se calcula la opacidad media de todas las córneas estabilizadas. Se seleccionan como control negativo (o de disolvente) al menos tres córneas con valores de opacidad próximos al valor medio de todas las córneas. El resto de las córneas se distribuye después en grupos de tratamiento y de control positivo.

▼M2

23. Como la capacidad térmica del agua es superior a la del aire, el agua ofrece condiciones de temperatura más estables para la incubación. Por tanto, se recomienda utilizar un baño de agua para mantener los soportes de córnea y su contenido a 32 ± 1 °C. Sin embargo, también pueden utilizarse incubadoras de aire, si se toman precauciones para mantener la estabilidad de la temperatura (por ejemplo, precalentando los soportes y los medios).

Aplicación de la sustancia problema

24. Se utilizan dos protocolos de tratamiento diferentes, uno para líquidos y agentes tensioactivos (sólidos o líquidos) y otro para sólidos que no son agentes tensioactivos.

25. Los líquidos se someten a ensayo sin diluir, mientras que los agentes tensioactivos se llevan antes a una concentración del 10 % p/v en solución de cloruro sódico al 0,9 %, agua destilada u otro disolvente del que se haya demostrado que no posee efectos negativos sobre el sistema de ensayo. Los semisólidos, cremas y ceras se someten a ensayo en principio como líquidos. Debe justificarse adecuadamente si se utilizan otras concentraciones de dilución. Las córneas se exponen a los líquidos y agentes tensioactivos durante 10 minutos. La utilización de otros tiempos de exposición exige una explicación científica adecuada.

26. Los sólidos que no son agentes tensioactivos se someten a ensayo en principio como soluciones o suspensiones a una concentración del 20 % en solución de cloruro sódico al 0,9 %, agua destilada u otro disolvente del que se haya demostrado que no posee efectos negativos sobre el sistema de ensayo. En ciertas circunstancias y con una justificación científica adecuada, es posible someter a ensayo los sólidos sin diluir mediante aplicación directa sobre la superficie de la córnea, utilizando el método de cámara abierta (véase el punto 29). Las córneas se exponen a los sólidos durante cuatro horas, pero, como sucede con los líquidos y agentes tensioactivos, es posible utilizar otros tiempos de exposición si se cuenta con una explicación científica adecuada.

27. Pueden utilizarse distintos métodos de tratamiento, en función de la naturaleza física y de las características químicas de la sustancia problema (por ejemplo, sólidos, líquidos, líquidos viscosos frente a líquidos no viscosos). El factor crítico consiste en velar por que la sustancia problema cubra adecuadamente la superficie epitelial y se elimine adecuadamente durante las fases de lavado. Suele utilizarse un método de cámara cerrada cuando se estudian sustancias problema líquidas desde no viscosas hasta ligeramente viscosas, mientras que se usa en principio un método de cámara abierta con sustancias problema líquidas viscosas y semiviscosas, así como con sólidos sin diluir.

28. En el método de cámara cerrada, se introduce en la cámara anterior (a través de los orificios de administración que se encuentran en la superficie superior de la cámara) una cantidad suficiente de sustancia problema (750 µL) para cubrir la cara epitelial de la córnea, y los agujeros se tapan a continuación con los tapones de la cámara durante la exposición. Es importante que cada córnea quede expuesta a una sustancia problema durante el periodo adecuado.

29. En el método de cámara abierta, antes del tratamiento se retiran el anillo de cierre de la ventana y la ventana de cristal de la cámara anterior. La sustancia problema o de control (750 µL, o una cantidad suficiente de sustancia problema para cubrir completamente la córnea) se aplica directamente sobre la superficie epitelial de la córnea utilizando una micropipeta. Si una sustancia problema resulta difícil de pipetear, puede introducirse a presión en una pipeta del tipo de desplazamiento positivo para facilitar su aplicación. La punta de pipeta de la pipeta de desplazamiento positivo se inserta en la punta de dispensación de la jeringa, de forma que el material pueda cargarse en la punta de desplazamiento bajo presión. Simultáneamente, se oprime el émbolo de la jeringa mientras se arrastra hacia arriba el pistón de la pipeta. Si aparece alguna burbuja de aire en la punta de la pipeta, se retira (se expulsa) el producto problema y se repite el proceso hasta que la punta se quede llena sin ninguna burbuja de aire. En caso necesario, puede utilizarse una jeringa normal (sin aguja), ya que permite medir un volumen exacto de sustancia problema y facilita su aplicación sobre la superficie epitelial de la córnea. Tras la aplicación de la sustancia, se vuelve a colocar la ventana de cristal de la cámara anterior para crear de nuevo un sistema cerrado.

▼M2

Incubación tras la exposición

30. Tras el periodo de exposición, la sustancia problema, el control negativo o la sustancia de control positivo se retiran de la cámara anterior y se lava el epitelio al menos tres veces (o hasta que no quede ningún rastro visible de la sustancia problema) utilizando EMEM con rojo de fenol. Se utiliza para el lavado el medio con rojo de fenol porque observando el cambio de color de esta sustancia puede determinarse la efectividad del lavado de materias ácidas o alcalinas. Las córneas se lavan más de tres veces si el rojo de fenol sigue sin colorearse (amarillo o púrpura) o sigue viéndose la sustancia problema. Una vez el medio ha quedado libre de sustancia problema, se lavan las córneas una última vez con EMEM sin rojo de fenol. Se utiliza EMEM sin rojo de fenol en el lavado final para eliminar el rojo de fenol de la cámara anterior antes de medir la opacidad. La cámara anterior vuelve a llenarse a continuación con EMEM nuevo sin rojo de fenol.

31. En el caso de líquidos o agentes tensioactivos, las córneas, una vez lavadas, se incuban otras dos horas a 32 ± 1 °C. En ciertas circunstancias puede ser útil prolongar este tiempo tras la exposición, extremo que debe estudiarse en cada caso. Las córneas tratadas con sólidos se lavan a fondo al final del periodo de exposición de cuatro horas, pero no es necesario prolongar su incubación.

32. Al final del periodo de incubación tras la exposición en el caso de líquidos y agentes tensioactivos y al final del periodo de exposición de cuatro horas en el caso de sólidos que no son agentes tensioactivos, se registran la opacidad y la permeabilidad de cada córnea. Asimismo, se observa visualmente cada córnea y se registran las observaciones pertinentes (por ejemplo, abrasión tisular, sustancia problema residual, opacidad no uniforme). Estas observaciones pueden ser importantes ya que pueden reflejarse en variaciones de las lecturas del opacímetro.

Sustancias de control

33. En cada experimento se incluyen controles simultáneos negativos (o del disolvente/vehículo) y positivos.

34. Cuando se somete a ensayo una sustancia líquida al 100 %, se incluye en el método de ensayo BCOP un control negativo simultáneo (por ejemplo, solución de cloruro sódico al 0,9 % o agua destilada), de forma que puedan detectarse los eventuales cambios inespecíficos del sistema de ensayo y se disponga de una base de referencia para los parámetros del ensayo. También permite evitar que las condiciones del ensayo provoquen de forma inadecuada una respuesta de irritación.

35. Cuando se somete a ensayo una sustancia líquida diluida, un agente tensioactivo o un sólido, se incluye en el método de ensayo BCOP un grupo de control simultáneo del disolvente/vehículo, de forma que puedan detectarse los eventuales cambios inespecíficos del sistema de ensayo y se disponga de una base de referencia para los parámetros del ensayo. Solo pueden utilizarse disolventes/vehículos de los que se haya demostrado que carecen de efectos adversos sobre el sistema de ensayo.

36. Se incluye como control positivo simultáneo en cada experimento un agente irritante ocular conocido, a fin de verificar que se provoca una respuesta adecuada. Como en el presente método se utiliza el ensayo BCOP para identificar agentes corrosivos o irritantes intensos, lo mejor es que el control positivo sea una sustancia de referencia que induzca una respuesta intensa con este método de ensayo. Sin embargo, para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del control positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta de irritación.

37. Pueden citarse como ejemplos de controles positivos en caso de sustancias problema líquidas la dimetilformamida o el hidróxido sódico al 1 %. Como ejemplo de control positivo en caso de sustancias problema sólidas está el imidazol al 20 % (peso/volumen) en solución de cloruro sódico al 0,9 %.

▼M2

38. Es útil disponer de sustancias de referencia para evaluar el potencial de irritación ocular de sustancias desconocidas dentro de una clase específica de sustancias o productos, o para evaluar la capacidad de irritación relativa de un agente irritante ocular dentro de una gama específica de respuestas de irritación.

Parámetros medidos

39. La opacidad se determina mediante la cantidad de luz transmitida a través de la córnea. La opacidad de la córnea se mide cuantitativamente con ayuda de un opacímetro, que permite medir los valores de opacidad en una escala continua.

40. La permeabilidad se determina por la cantidad de pigmento fluoresceína sódica que penetra en todas las capas de células de la córnea (es decir, desde el epitelio de la superficie exterior de la córnea hasta el endotelio de su superficie interior). Se añade a la cámara anterior del soporte de córnea 1 mL de solución de fluoresceína sódica (4 o 5 mg/mL cuando se estudian líquidos y agentes tensioactivos o sólidos no tensioactivos, respectivamente), en contacto con el lado epitelial de la córnea, mientras que la cámara posterior, en contacto con el lado endotelial de la córnea, se llena con EMEM nuevo. El soporte se incuba a continuación en posición horizontal durante 90 ± 5 min a 32 ± 1 °C. La cantidad de fluoresceína sódica que atraviesa la córnea hasta la cámara posterior se mide cuantitativamente mediante espectrofotometría UV/VIS. Las mediciones espectrofotométricas evaluadas a 490 nm se registran como valores de absorbancia o densidad óptica (DO_{490}), medidos en una escala continua. Los valores de permeabilidad a la fluoresceína se determinan utilizando los valores de DO_{490} conseguidos mediante un espectrofotómetro de luz visible con un camino óptico normal de 1 cm.

41. También puede utilizarse un lector de placa de microvaloración de 96 pocillos siempre que: a) pueda establecerse la banda de linealidad del lector de placas para determinar los valores de DO_{490} de fluoresceína; y b) se utilice el volumen correcto de muestras de fluoresceína en la placa de 96 pocillos para obtener unos valores de DO_{490} equivalentes a los conseguidos con un camino óptico normal de 1 cm (esto puede exigir que los pocillos estén completamente llenos [generalmente, 360 µL]).

DATOS E INFORME

Evaluación de los datos

42. Una vez corregidos los valores de opacidad y de permeabilidad media (DO_{490}) para tener en cuenta los valores de opacidad de fondo y de permeabilidad (DO_{490}) del control negativo, los valores medios de opacidad y permeabilidad (DO_{490}) se combinan en una fórmula empírica para calcular la puntuación de la capacidad de irritación *in vitro* (IVIS) de cada grupo de tratamiento, de la manera siguiente:

$$\text{IVIS} = \text{valor medio de opacidad} + (15 \times \text{valor medio de permeabilidad } [DO_{490}])$$

Sina *et al.* (16) comunican que esta fórmula se ha obtenido mediante estudios internos e interlaboratorios. Los datos obtenidos con una serie de 36 compuestos en un estudio interlaboratorios se sometieron a análisis con múltiples variables para determinar la ecuación que se ajustara mejor a los datos in vivo e in vitro. Este análisis fue efectuado por científicos de dos empresas diferentes, que propusieron ecuaciones casi idénticas.

43. Los valores de opacidad y permeabilidad deben evaluarse también independientemente para determinar si una sustancia problema ha inducido corrosividad o irritación intensa mediante solo uno de los dos parámetros (véase la parte siguiente, sobre criterios de decisión).

▼M2

Criterios de decisión

44. Las sustancias que induzcan una IVIS ≥ 55,1 se definen como corrosivas o irritantes intensas. Como se indica en el punto 1, si la sustancia problema no se identifica como corrosiva o irritante intensa para los ojos, deben realizarse otras pruebas con fines de clasificación y etiquetado. El método de ensayo BCOP tiene una exactitud general del 79 % (113/143) al 81 % (119/147), una tasa de falsos positivos del 19 % (20/103) al 21 % (22/103), y una tasa de falsos negativos del 16 % (7/43) al 25 % (10/40), en relación con los datos obtenidos mediante el método de ensayo de ojos de conejo *in vivo*, clasificados según los sistemas de clasificación de la EPA (1), UE (2), o SGA (3). Si se excluyen de la base de datos las sustancias de ciertas clases químicas (es decir, alcoholes y cetonas) o físicas (es decir, sólidos), la exactitud del método BCOP en el conjunto de los sistemas de clasificación de la UE, EPA y SGA varía del 87 % (72/83) al 92 % (78/85), las tasas de falsos positivos van del 12 % (7/58) al 16 % (9/56), y las tasas de falsos negativos van del 0 % (0/27) al 12 % (3/26).

45. Incluso aunque una sustancia problema no se clasifique como corrosiva o irritante intensa para los ojos, los datos del BCOP pueden ser útiles, junto con los datos del ensayo *in vivo* con ojos de conejo o de otro ensayo *in vitro* validado adecuadamente, para seguir evaluando la utilidad y las limitaciones del método de ensayo BCOP a efectos de la detección de agentes irritantes no intensos y agentes no irritantes (se está elaborando un documento de orientación sobre el uso de métodos de ensayo *in vitro* de la toxicidad ocular).

Criterios de aceptación del estudio

46. Se considera que un ensayo es aceptable si el control positivo da una IVIS comprendida en el intervalo de dos desviaciones típicas respecto a la media histórica del momento, que debe actualizarse al menos cada tres meses, o cada vez que se efectúe un ensayo aceptable en caso de laboratorios en los que no sea frecuente efectuar estos ensayos (es decir, con una frecuencia que no llegue a mensual). Las respuestas de los controles negativos o del disolvente/vehículo deben llevar a unos valores de opacidad y permeabilidad inferiores a los límites superiores establecidos para los valores de opacidad y permeabilidad de fondo de las córneas de bovino tratadas con el respectivo control negativo o del disolvente/vehículo.

Informe del ensayo

47. El informe del ensayo debe incluir la siguiente información, en caso de que corresponda a la realización del estudio:

Sustancias problema y de control

Denominación o denominaciones químicas, como la denominación estructural utilizada por el Chemical Abstracts Service (CAS), seguida por otras denominaciones, si se conocen;

El número de registro CAS, si se conoce;

La pureza y la composición de la sustancia o mezcla (en porcentajes en peso), en la medida en que se disponga de esta información;

Propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio, como estado físico, volatilidad, pH, estabilidad, clase química o hidrosolubilidad;

Tratamiento de las sustancias problema y de control antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

Estabilidad, si se conoce.

▼M2

Información referente al promotor y al laboratorio

Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

Identificación de la fuente de los ojos (es decir, instalación en la que se han recogido);

Condiciones de almacenamiento y transporte de los ojos (por ejemplo, fecha y hora de recogida de los ojos, plazo transcurrido hasta el inicio del ensayo, medios de transporte y condiciones de temperatura, uso eventual de antibióticos);

Características específicas de los animales de los que se han extraído los ojos (por ejemplo, edad, sexo, peso del animal), si se dispone de estos datos.

Justificación del método de ensayo y del protocolo utilizados

Integridad del método de ensayo

Procedimiento utilizado para garantizar la integridad (es decir, la exactitud y la fiabilidad) del método de ensayo a lo largo del tiempo (por ejemplo, ensayo periódico de sustancias utilizadas para demostrar la aptitud, utilización de datos anteriores de controles negativos y positivos).

Criterios de aceptabilidad del ensayo

Bandas aceptables de controles positivos y negativos simultáneos según los datos anteriores;

Cuando corresponda, bandas aceptables de controles de referencias simultáneos según los datos anteriores.

Condiciones del ensayo

Descripción del sistema de ensayo utilizado;

Tipo de soporte de córnea utilizado;

Información sobre la calibración de los dispositivos utilizados para medir la opacidad y la permeabilidad (por ejemplo, opacímetro y espectrofotómetro);

Información sobre las córneas de bovino utilizadas, incluidas declaraciones sobre su calidad;

Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;

Concentraciones utilizadas de la sustancia problema;

Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

Referencia a datos anteriores del modelo (por ejemplo, controles negativos y positivos, sustancias utilizadas para demostrar la aptitud, sustancias de referencia);

Descripción de los criterios de evaluación seguidos.

Resultados

Presentación en forma de cuadro de los datos correspondientes a las distintas muestras problema (por ejemplo, valores de opacidad y DO_{490} e IVIS calculada para la sustancia problema y los controles positivos, negativos y de referencia [si se utilizan], incluidos los datos procedentes de los experimentos repetidos en paralelo cuando corresponda, y las medias ± la desviación típica de cada experimento);

Descripción de otros efectos observados.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼**M2**

(2) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006. DO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

(3) Naciones Unidas (2007). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), segunda edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2007. Disponible en la dirección:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_s.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible en la dirección:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. DO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

(7) OCDE (2002). Directrices de ensayo TG 405. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Disponible en la dirección:

[http://www.oecd.org/document/40/
0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italia: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible en la dirección:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo.

Sustancias de referencia: Sustancias utilizadas como patrón para comparar con una sustancia problema. Las sustancias de referencia deben presentar las siguientes propiedades: a) una fuente coherente y fiable; b) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema; c) características físicas y químicas conocidas; d) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y e) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

Córnea: Parte transparente delantera del globo ocular que cubre el iris y la pupila y permite el paso de la luz al interior.

Opacidad de la córnea: Medición del grado de opacidad de la córnea tras su exposición a una sustancia problema. Un aumento de la opacidad de la córnea indica que esta ha sufrido una lesión. La opacidad puede evaluarse subjetivamente, como se hace en el ensayo con ojo de conejo de Draize, u objetivamente con un instrumento como un «opacímetro».

Permeabilidad de la córnea: Medición cuantitativa de la lesión del epitelio corneal mediante determinación de la cantidad del pigmento fluoresceína sódica que pasa a través de todas las capas de células corneales.

Categoría 1 de la EPA: Corrosión (destrucción irreversible del tejido ocular) o afectación o irritación de la córnea, persistente durante más de 21 días (1).

Categoría R41 de la UE: Producción de una lesión de los tejidos oculares o un deterioro físico importante de la visión, como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema a la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación (2).

Tasa de falsos negativos: Proporción de todas las sustancias positivas identificadas erróneamente como negativas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Tasa de falsos positivos: Proporción de todas las sustancias negativas identificadas erróneamente como positivas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos): Sistema que propone la clasificación de sustancias químicas y sus mezclas según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta a emergencias) y al medio ambiente (3).

▼M2

Categoría 1 del SGA: Producción de una lesión de los tejidos oculares o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación (3).

Peligro: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

Puntuación de la capacidad de irritación *in vitro* (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS): Fórmula empírica utilizada en el ensayo BCOP mediante la cual se combinan en una sola puntuación *in vitro* los valores medios de opacidad y de permeabilidad de cada grupo de tratamiento. IVIS = valor medio de opacidad + (15 x valor medio de permeabilidad).

Control negativo: Muestra paralela no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con sustancia problema y otras muestras de control para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

Sustancias no irritantes: Sustancias no clasificadas como irritantes oculares en las categorías I, II, o III de la EPA, en la categoría R41 o R36 de la UE, ni en las categorías 1, 2A o 2B del SGA.

Sustancias corrosivas oculares: a) Sustancias que provocan una lesión irreversible de los tejidos oculares; b) sustancias clasificadas como irritantes oculares de la categoría 1 del SGA, categoría I de la EPA, o categoría R41 de la UE (1) (2) (3).

Sustancias irritantes oculares: a) Sustancias que producen un cambio reversible en el ojo como consecuencia de su aplicación a la superficie anterior de este; b) sustancias clasificadas como irritantes oculares de la categoría II o III de la EPA, categoría R36 de la UE, o en las categorías 2A o 2B del SGA (1) (2) (3).

Sustancias irritantes intensas oculares: a) Sustancias que provocan lesiones de los tejidos oculares como consecuencia de su aplicación a la superficie anterior del ojo, y que no se resuelven en los 21 días siguientes a la aplicación, o una degradación física severa de la visión; b) sustancias clasificadas como irritantes oculares de la categoría 1 del SGA, categoría I de la EPA, o categoría R41 de la UE (1) (2) (3).

Opacímetro: Instrumento utilizado para medir la opacidad de la córnea evaluando cuantitativamente la transmisión de la luz a través de esta. El instrumento clásico tiene dos compartimentos, cada uno provisto de su propia fuente de luz y una célula fotoeléctrica. Un compartimento se utiliza para la córnea tratada, y el otro para calibrar y poner a cero el instrumento. Se envía la luz de una lámpara halógena a una célula fotoeléctrica a través de un compartimento de control (cámara vacía sin ventanas ni líquido) y se compara con la luz enviada a una célula fotoeléctrica a través del compartimento experimental, que alberga a la cámara que contiene la córnea. Se compara la diferencia en la transmisión luminosa a partir de las células fotoeléctricas y se presenta un valor numérico de opacidad en un indicador digital.

Control positivo: Muestra paralela que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del control positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la intensidad de la respuesta.

▼M2

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio o en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios.

Control del disolvente/vehículo: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con sustancia problema y otras muestras de control, a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las muestras tratadas con la sustancia problema disuelta en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control negativo simultáneo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

Ensayo gradual: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre una sustancia problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de los datos en cada fase, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar a la fase siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de una sustancia problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de una sustancia problema con la información disponible, se aplica un procedimiento secuencial de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación inequívoca.

Método de ensayo validado: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado puede tener un comportamiento insuficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto.

Ponderación de los datos: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de una sustancia.

▼M2

Apéndice 2

Sustancias utilizadas para demostrar la aptitud del método de ensayo BCOP

Antes de proceder al uso sistemático de un método de ensayo que se ajuste al presente método de ensayo, es posible que los laboratorios deseen demostrar su aptitud técnica, identificando correctamente la clasificación de las diez sustancias recomendadas del cuadro 1 en cuanto a su corrosividad ocular. Estas sustancias se han seleccionado para representar la gama de respuestas de irritación/corrosión ocular local, sobre la base de los resultados conseguidos en el ensayo con ojo de conejo *in vivo* (TG 405) (es decir, categorías 1, 2A, 2B o no clasificada ni etiquetada según el SGA de la ONU (3) (7). Sin embargo, considerando la utilidad validada de estos ensayos (es decir, identificar solamente sustancias corrosivas/irritantes intensas oculares), solo hay dos resultados del ensayo a efectos de clasificación (sustancia corrosiva / irritante intensa o sustancia no corrosiva / no irritante intensa) para demostrar la aptitud del método. Otros criterios de selección son que las sustancias se encuentren en el mercado, que se disponga de datos de referencia *in vivo* de calidad, y que haya datos de calidad procedentes de los dos métodos *in vitro* para los que se están elaborando directrices de ensayo. Por este motivo, se han seleccionado sustancias irritantes de la lista recomendada por el ICCVAM de 122 sustancias de referencia para la validación de métodos de ensayo de la toxicidad ocular *in vitro* (véase el apéndice H: Sustancias de referencia recomendadas por el ICCVAM) (5). Se encuentran datos de referencia en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM para el método de ensayo BCOP y para el de ojo de pollo aislado (ICE) (17) (18).

Cuadro 1

Sustancias recomendadas para demostrar la aptitud técnica con el BCOP

Sustancia	Nº CAS	Clase química ([1])	Estado físico	Clasificación *in vivo* ([2])	Clasificación *in vitro* ([3])
Cloruro de benzalconio (5 %)	8001-54-5	Compuesto onio	Líquido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Clorhexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, éster	Sólido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Imidazol	288-32-4	Heterociclo	Sólido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Cloruro de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Haluro de acilo	Líquido	Categoría 2A	No corrosivo/no irritante intenso
2-Metil-acetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, éster	Líquido	Categoría 2B	No corrosivo/no irritante intenso
Nitrato de amonio	6484-52-2	Sal inorgánica	Sólido	Categoría 2A	No corrosivo/no irritante intenso

▼**M2**

Glicerol	56-81-5	Alcohol	Líquido	Noetiquetado	No corrosivo/no irritante intenso
n-Hexano	110-54-3	Hidrocarburo (acíclico)	Líquido	Noetiquetado	No corrosivo/no irritante intenso

Abreviaturas: Nº CAS: número de registro del Chemical Abstracts Service

([1]) La clase química se ha asignado a cada sustancia problema utilizando un sistema de clasificación habitual, basado en el sistema de clasificación de materias médicas de la National Library of Medicine (MeSH) (se puede encontrar en la dirección http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE) y utilizando el SGA de la ONU (3) (7).

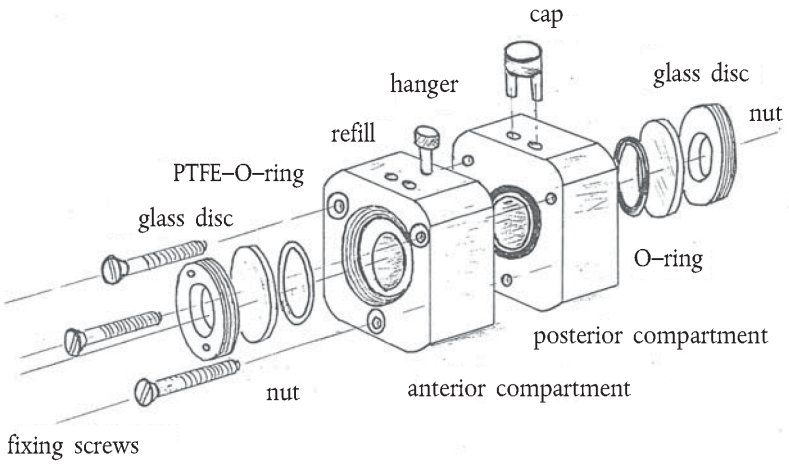
([3]) Sobre la base de los resultados obtenidos con el método de ensayo BCOP y con el ICE.

▼M2

Apéndice 3

SOPORTE DE CÓRNEA PARA EL MÉTODO BCOP

1. Los soportes de córnea para el método BCOP se hacen de material inerte, como polipropileno. Los soportes están formados por dos mitades (una cámara anterior y una cámara posterior), y tienen dos cámaras internas cilíndricas similares. Cada cámara alberga un volumen de 5 mL y termina en una ventana de cristal, a través de la cual se efectúan las mediciones de la opacidad. Cada cámara interna tiene unas dimensiones de 1,7 cm de diámetro y 2,2 cm de profundidad ([1]). Para evitar fugas se utiliza una junta tórica situada en la cámara posterior. Las córneas se colocan, con el lado endotelial hacia abajo, sobre la junta tórica de las cámaras posteriores, y las cámaras anteriores se colocan sobre el lado epitelial de las córneas. Las cámaras se mantienen en su posición mediante tres tornillos inoxidables situados en los bordes externos de la cámara. El extremo de cada cámara tiene una ventana de cristal que puede retirarse para facilitar el acceso a la córnea. Para evitar fugas, se pone también una junta tórica entre la ventana de cristal y la cámara. En la parte superior de cada cámara hay dos agujeros que permiten introducir y retirar el medio y las sustancias problema. Se cierran con tapones de goma durante los periodos de tratamiento y de incubación.



Glosario

Glass disc: Disco de cristal

PTFE-O-ring: Junta tórica de PTFE

Refill: Relleno

Hanger: Asa

Cap: Tapón

Nut: Tuerca

O-ring: Junta tórica

Posterior compartment: Compartimento posterior

Anterior compartment: Compartimento anterior

Fixing screws: Tornillos de fijación

([1]) Estas dimensiones corresponden al soporte de córnea utilizado para vacas de entre 12 y 60 meses de edad. En caso de que se utilicen animales de entre 6 y 12 meses de edad, puede ser necesario diseñar el soporte de manera que cada cámara albergue un volumen de 4 mL, y cada una de las cámaras internas mida 1,5 cm de diámetro y 2,2 cm de profundidad. Es importante que en todos los soportes de córnea de nuevo diseño la proporción entre la superficie de córnea expuesta y el volumen de la cámara posterior sea la misma que en el soporte de córnea tradicional. Se trata de una condición necesaria para asegurar que los valores de permeabilidad se determinan correctamente a efectos del cálculo de la puntuación IVIS con la fórmula propuesta.

▼**M2**

OPACÍMETRO

2. El opacímetro es un dispositivo que mide la transmisión luminosa. Se envía a una célula fotoeléctrica la luz de una lámpara halógena a través de un compartimento de control (cámara vacía sin ventanas ni líquido) y se compara con la luz enviada a una célula fotoeléctrica a través del compartimento experimental, que alberga la cámara que contiene la córnea. Se compara la diferencia en la transmisión luminosa a partir de las células fotoeléctricas y se presenta un valor numérico de opacidad en un indicador digital. Se determina el número de unidades de opacidad.

3. Las respuestas del opacímetro deben ser lineales a lo largo de una gama de lecturas de opacidad que incluya los valores de corte utilizados para las diferentes clasificaciones descritas por el modelo de predicción (es decir, hasta el valor de corte que determina la corrosividad / capacidad de irritación intensa). Para garantizar que las lecturas son lineales y exactas hasta la zona de 75-80 unidades de opacidad, es necesario calibrar el opacímetro utilizando una serie de calibradores. Estos (que son unas hojas opacas de poliéster) se introducen en la cámara de calibración (cámara para córneas diseñada para contener los calibradores) y se toman las lecturas en el opacímetro. La cámara de calibración está designada para mantener los calibradores a la misma distancia aproximadamente entre la luz y la célula fotoeléctrica a la que se colocarían las córneas durante las mediciones de la opacidad. El opacímetro se calibra en primer lugar a cero unidades de opacidad utilizando la cámara de calibración sin ningún calibrador. A continuación se ponen en esta cámara tres calibradores diferentes, uno a uno, y se miden las opacidades correspondientes. A los calibradores 1, 2 y 3 deben corresponderles unas lecturas de opacidad iguales a sus valores establecidos de 75, 150, y 225 unidades de opacidad, respectivamente, ± 5 %.

▼M2

B. 48. MÉTODO DE ENSAYO DE OJO DE POLLO AISLADO PARA DETECTAR AGENTES CORROSIVOS E IRRITANTES INTENSOS PARA LOS OJOS

INTRODUCCIÓN

1. El método de ensayo de ojo de pollo aislado (*Isolated Chicken Eye*, ICE) es un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse, en ciertas circunstancias y con limitaciones específicas, para clasificar sustancias y mezclas como agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos (1) (2) (3). A efectos de este método de ensayo, se entiende por «agentes irritantes intensos» aquellos que inducen lesiones oculares que persisten en el conejo durante al menos 21 días tras su administración. Aunque no se considera válido para sustituir completamente al ensayo *in vivo* en ojo de conejo, se recomienda utilizar el ICE como parte de una estrategia de ensayo gradual para la clasificación normativa y el etiquetado dentro de un ámbito específico de aplicabilidad (4) (5). Las sustancias y mezclas problema (6) que den resultado positivo en este ensayo pueden clasificarse como agentes corrosivos o irritantes intensos sin necesidad de efectuar más pruebas con conejos. Las sustancias que den resultado negativo tendrían que someterse a ensayo con conejos siguiendo una estrategia de ensayo secuencial, como se describe en las Directrices de ensayo 405 de la OCDE (7) (método B.5 del presente anexo).

2. El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar la posible corrosividad o capacidad de irritación intensa para los ojos de una sustancia problema en función de su capacidad para causar toxicidad en un ojo enucleado de pollo. Los efectos tóxicos sobre la córnea se miden mediante a) una evaluación cualitativa de la opacidad, b) una evaluación cualitativa de las lesiones provocadas al epitelio sobre la base de una aplicación de fluoresceína en el ojo (retención de fluoresceína), c) una medición cuantitativa del aumento del espesor (inflamación), y d) una evaluación cualitativa de las lesiones morfológicas macroscópicas de la superficie. Las evaluaciones de la opacidad, la inflamación y las lesiones de la córnea tras la exposición de esta a una sustancia problema se efectúan por separado y después se combinan para llegar a una clasificación de la capacidad de irritación ocular.

3. También se han ensayado utilizando el método ICE agentes irritantes oculares que provocan lesiones que desaparecen en menos de 21 días, así como agentes no irritantes. Sin embargo, no se han evaluado oficialmente la exactitud ni la fiabilidad del método de ensayo ICE respecto a las sustancias de estas categorías.

4. En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

5. El presente método de ensayo se basa en el protocolo del método de ensayo ICE del Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos estadounidense (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (8), elaborado siguiendo un estudio de validación internacional (4) (5) (9), con aportaciones del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), del Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM), y del Departamento de Toxicología y Farmacología Aplicada de Calidad de la Vida de TNO de los Países Bajos (TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology). El protocolo se basa en la información obtenida a partir de protocolos publicados, así como del protocolo actualmente utilizado por TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Las limitaciones que se han detectado en este método están relacionadas con la tasa de falsos resultados positivos de alcoholes y con las tasas de falsos resultados negativos de sólidos y sustancias tensioactivas (véase el punto 47) (4). Si se excluyen de la base de datos las sustancias de estas clases químicas y físicas, mejora sustancialmente la exactitud del ensayo ICE en los sistemas de clasificación de la UE, EPA y SGA (4). Teniendo en cuenta el objeto de este ensayo (es decir, tan solo identificar agentes corrosivos o irritantes intensos para los ojos), no importa que sean elevadas las tasas de falsos resultados negativos, ya que las sustancias correspondientes se someterían posteriormente a ensayo con conejos o a otros ensayos *in vitro* validados adecuadamente, en función de las exigencias normativas, utilizando una estrategia de ensayo secuencial en un enfoque de ponderación de los datos. Por otra parte, la actual base de datos de validación no permite una evaluación adecuada de algunas clases de sustancias o productos (por ejemplo, mezclas). Sin embargo, los investigadores pueden considerar la posibilidad de utilizar este método de ensayo para estudiar todos los tipos de material (incluidas las mezclas), con lo cual un resultado positivo podría aceptarse como indicación de una respuesta corrosiva o irritante intensa para los ojos. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos con alcoholes deben interpretarse con precaución, debido al riesgo de sobrepredicción.

7. Todos los procedimientos con ojos de pollo deben ajustarse a las normas y procedimientos aplicables de la instalación de ensayo en relación con la manipulación de materiales derivados del hombre o de animales, entre los que figuran los tejidos o los líquidos intersticiales. Se recomienda observar las precauciones universales de laboratorio (15).

8. Una de las limitaciones del método de ensayo consiste en que, a pesar de que tiene en cuenta algunos de los efectos oculares evaluados con el método de ensayo de la capacidad de irritación ocular en el conejo y, hasta cierto punto, su gravedad, no atiende a las lesiones de la conjuntiva ni del iris. Asimismo, aunque la reversibilidad de las lesiones de la córnea no puede evaluarse *per se* en el ensayo ICE, se ha propuesto, sobre la base de los estudios en ojo de conejo, que la evaluación de la profundidad inicial de la lesión de la córnea puede utilizarse para distinguir entre efectos reversibles e irreversibles (16). Finalmente, el método de ensayo ICE no permite la evaluación del potencial de toxicidad sistémica asociado con la exposición ocular.

9. Se está trabajando actualmente para seguir caracterizando la utilidad y las limitaciones del método de ensayo ICE para detectar los agentes irritantes no intensos y los agentes no irritantes (véase también el punto 48). También se anima a los usuarios a presentar muestras o datos a las organizaciones de validación para una evaluación oficial de posibles usos futuros del método de ensayo ICE, incluida la detección de agentes irritantes no intensos y agentes no irritantes.

10. Cuando algún laboratorio establezca inicialmente este ensayo, deben utilizarse las sustancias para demostrar la aptitud que se indican en el apéndice 2. Los laboratorios pueden utilizar estas sustancias para demostrar su competencia técnica en la realización del método de ensayo ICE antes de presentar, con fines de clasificación normativa de peligros, los datos obtenidos con este ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El método de ensayo ICE es un modelo organotípico con mantenimiento a corto plazo del ojo de pollo *in vitro*. En este método de ensayo, las lesiones provocadas por la sustancia problema se evalúan determinando la inflamación, la opacidad y la retención de fluoresceína en la córnea. Mientras que los dos últimos parámetros implican una evaluación cualitativa, el análisis de la inflamación de la córnea permite una evaluación cuantitativa. Cada medición se convierte en una puntuación cuantitativa utilizada para calcular un índice general de irritación, o bien se somete a una categorización cualitativa para asignarle una clasificación de corrosividad y capacidad de irritación intensa ocular *in vitro*. Cada uno de estos resultados puede utilizarse a continuación para predecir el potencial de corrosividad o capacidad de irritación intensa de una sustancia problema (véanse los criterios de decisión).

▼M2

Fuente y edad de los ojos de pollo

12. Tradicionalmente se han venido utilizando para este ensayo los ojos tomados de pollos obtenidos de mataderos donde se sacrifican para el consumo humano, con lo que se suprime la necesidad de disponer de animales de laboratorio. Solo se utilizan los ojos de animales sanos considerados adecuados para entrar en la cadena alimentaria humana.

13. Aunque aún no se ha efectuado ningún estudio comparativo para evaluar la edad óptima de los pollos, la edad y el peso de los pollos usados tradicionalmente en este método de ensayo corresponden a los pollos tiernos que se suelen tratar en los mataderos de aves de corral (es decir, de unas siete semanas de edad y entre 1, 5 y 2,5 kg).

Recogida y transporte de los ojos al laboratorio

14. Las cabezas deben retirarse inmediatamente después de la sedación de los pollos, generalmente por choque eléctrico, y de la incisión del cuello para su sangrado. Las fuentes locales de pollos deben estar situadas cerca del laboratorio de forma que las cabezas puedan transferirse desde el matadero al laboratorio en poco tiempo, a fin de reducir al mínimo el deterioro y la contaminación bacteriana. Debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la recogida de las cabezas de pollo y la utilización de los ojos en el método de ensayo ICE (lo normal es que no exceda de dos horas), y hay que demostrar que ese tiempo no altera los resultados del ensayo. Estos resultados se basan en los criterios de selección de los ojos, así como en las respuestas obtenidas con controles positivos y negativos. Todos los ojos utilizados en el ensayo deben proceder del mismo grupo de ojos recogidos un día concreto.

15. Como los ojos se disecan en el laboratorio, las cabezas intactas se transportan desde el matadero a temperatura ambiente en cajas de plástico humidificadas mediante toallas mojadas con solución salina isotónica.

Criterios de selección de los ojos utilizados en el ICE

16. Se desechan los ojos que tienen una elevada tinción de fluoresceína de base (es decir, > 0,5) o una elevada puntuación de opacidad de la córnea (es decir, > 0,5) una vez han sido enucleados.

17. Cada grupo de tratamiento y control positivo simultáneo consiste en al menos tres ojos. El grupo de control negativo o el control del disolvente (si se utiliza un disolvente distinto de la solución salina) consiste en al menos un ojo.

PROCEDIMIENTO

Preparación de los ojos

18. Se cortan los párpados cuidadosamente, procurando no dañar la córnea. se evalúa rápidamente la integridad de la córnea mediante la aplicación de una gota de fluoresceína sódica al 2 % (p/v) a la superficie de la córnea durante unos segundos, seguida de lavado con solución salina isotónica. Los ojos tratados con fluoresceína se examinan a continuación con un microscopio de lámpara de hendidura para asegurarse de que la córnea está ilesa (es decir, tiene puntuaciones de retención de fluoresceína y de opacidad de la córnea ≤ 0,5).

19. Los ojos que no presenten lesiones se extraen del cráneo, teniendo cuidado de no lesionar la córnea. El globo ocular se extrae de la órbita sujetando firmemente con pinzas quirúrgicas la membrana nictitante, y los músculos del ojo se cortan con unas tijeras curvas de punta roma. Es importante no causar lesiones a la córnea por una presión excesiva (es decir, artefactos de compresión).

20. Cuando se retira el ojo de la órbita, debe quedar con él una porción visible del nervio óptico. Una vez retirado de la órbita, el ojo se pone en una gasa hidrófila y se retiran, cortándolos, la membrana nictitante y demás tejidos conjuntivos.

▼M2

21. El ojo enucleado se monta en un soporte de acero inoxidable, con la córnea situada verticalmente. El soporte se transfiere a continuación a la cámara de un aparato de perfusión (16), donde se posiciona de manera que toda la córnea reciba el goteo de solución salina isotónica. Las cámaras de los aparatos de perfusión deben estar termostatizadas a 32 ± 1,5 °C. El apéndice 3 incluye un diagrama de un aparato de perfusión normal y del soporte para los ojos, que pueden obtenerse comercialmente o bien construirse en el propio laboratorio. El aparato puede modificarse para cubrir las necesidades de un laboratorio concreto (por ejemplo, para albergar un número diferente de ojos).

22. Una vez colocados en el aparato de perfusión, los ojos se vuelven a examinar con un microscopio de lámpara de hendidura para asegurarse de que no han sufrido ninguna lesión durante el proceso de disección. También debe medirse en este momento el espesor de la córnea en el vértice corneal, utilizando el medidor de profundidad con el microscopio de lámpara de hendidura. Deben sustituirse los ojos que presenten a) una puntuación de retención de fluoresceína > 0,5; b) una opacidad corneal > 0,5; o c) cualquier otro signo de lesión. En cuanto a los ojos que no se hayan rechazado por ninguno de estos criterios, deberán rechazarse también los ojos con una espesor de la córnea que se desvíe en más de un 10 % del valor medio de todos los ojos. Los usuarios deben ser conscientes de que con los microscopios de lámpara de hendidura pueden obtenerse diferentes mediciones del espesor de la córnea con diferentes ajustes de la anchura de la hendidura. Esta debe fijarse en 0,095 mm.

23. Una vez examinados y aprobados todos los ojos, se incuban durante unos 45 o 60 minutos para estabilizarlos con el sistema de ensayo antes de administrar la sustancia. Tras el periodo de estabilización, se registra una medición de referencia inicial del espesor y de la opacidad de la córnea que sirva como referencia de base (es decir, a tiempo = 0). La puntuación de fluoresceína determinada en el momento de la disección se utiliza como medición de base respecto a este parámetro.

Aplicación de la sustancia problema

24. Inmediatamente después de efectuar las mediciones de referencia inicial, se retira el ojo (en su soporte) del aparato de perfusión, se pone en posición horizontal y se aplica a la córnea la sustancia problema.

25. Normalmente, las sustancias problema líquidas se estudian sin diluir, pero, en caso necesario, pueden someterse a dilución (por ejemplo, como parte del diseño del estudio). El disolvente preferido para disolver estas sustancias es la solución salina fisiológica. Sin embargo, también pueden utilizarse otros disolventes en condiciones controladas, pero es necesario demostrar la idoneidad de los disolventes que sean distintos de la solución salina fisiológica.

26. Las sustancias problema líquidas se aplican a la córnea de forma que quede cubierta con la sustancia problema toda la superficie de la córnea de forma homogénea; el volumen normal es de 0,03 mL.

27. Cuando sea posible, las sustancias sólidas deben triturarse de la manera más fina posible con un mortero o con otro instrumento de trituración comparable. El polvo resultante se aplica a la córnea de forma que su superficie quede cubierta uniformemente con la sustancia problema; la cantidad normal es de 0,03 g.

28. La sustancia problema (líquida o sólida) se aplica durante 10 segundos y después se retira del ojo lavando con solución salina isotónica (aproximadamente 20 mL) a temperatura ambiente. El ojo (en su soporte) se vuelve a poner a continuación en el aparato de perfusión, en la posición vertical inicial.

Sustancias de control

29. En cada experimento se deben incluir controles simultáneos negativos (o del disolvente/vehículo) y positivos.

▼M2

30. Cuando se estudian líquidos al 100 % o sólidos, se utiliza solución salina fisiológica como control negativo simultáneo en el método de ensayo ICE a fin de detectar cambios inespecíficos del sistema de ensayo y garantizar que las condiciones del ensayo no provocan inadecuadamente una respuesta de irritación.

31. Cuando se estudian líquidos diluidos, se incluye en el método de ensayo un grupo de control simultáneo del disolvente/vehículo a fin de detectar cambios inespecíficos del sistema de ensayo y garantizar que las condiciones del ensayo no provocan inadecuadamente una respuesta de irritación. Como se indica en el punto 25, solo pueden utilizarse los disolventes/vehículos de los que se haya demostrado que carecen de efectos adversos sobre el sistema de ensayo.

32. Se incluye como control positivo simultáneo en cada experimento un agente irritante ocular conocido, a fin de verificar que se provoca una respuesta adecuada. Como en el presente método se utiliza el ensayo ICE para identificar agentes corrosivos o irritantes intensos, el control positivo debe ser una sustancia de referencia que induzca una respuesta intensa con este método de ensayo. No obstante, para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del control positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la intensidad de la respuesta. Debe generarse una cantidad suficiente de datos *in vitro* del control positivo, de forma que se pueda calcular una banda aceptable, definida estadísticamente, para el control positivo. Si no se dispone de datos anteriores adecuados con el método de ensayo ICE respecto a un control positivo determinado, es posible que deban efectuarse estudios para conseguir esta información.

33. Pueden citarse como ejemplo de controles positivos para sustancias problema líquidas el ácido acético al 10 % o el cloruro de benzalconio al 5 %, mientras que son ejemplos de controles positivos para sustancias problema sólidas el hidróxido sódico o el imidazol.

34. Es útil disponer de sustancias de referencia para evaluar el potencial de irritación ocular de sustancias desconocidas dentro de una clase específica de sustancias o productos, o para evaluar la capacidad de irritación relativa de un irritante ocular dentro de una gama específica de respuestas de irritación.

Parámetros medidos

35. Las córneas tratadas se evalúan antes de su tratamiento y empezando a los 30, 75, 120, 180 y 240 minutos (± 5 minutos) después del lavado tras el tratamiento. Esta cadencia permite conseguir un número adecuado de mediciones a lo largo del periodo de tratamiento de cuatro horas, dejando tiempo suficiente entre mediciones para que puedan efectuarse las observaciones requeridas con todos los ojos.

36. Los parámetros evaluados son la opacidad de la córnea, la inflamación, la retención de fluoresceína y los efectos morfológicos (por ejemplo, lesiones punteadas o aflojamiento del epitelio). A cada uno de los tiempos antes citados se determinan todos los parámetros, salvo la retención de fluoresceína (que se determina solo antes del tratamiento y a los 30 minutos tras la exposición a la sustancia problema).

37. Se recomienda tomar fotografías para documentar la opacidad de la córnea, la retención de fluoresceína, los efectos morfológicos y, en su caso, la histopatología.

38. Tras el examen final a las cuatro horas, los usuarios deberían conservar los ojos en un fijador adecuado (por ejemplo, formol neutro amortiguado) para su eventual examen histopatológico.

▼**M2**

39. La inflamación de la córnea se determina mediante mediciones del espesor de la córnea efectuadas con un paquímetro óptico en un microscopio de lámpara de hendidura. Se expresa en porcentaje y se calcula con la fórmula siguiente a partir de las mediciones del espesor de la córnea:

$$\left(\frac{\textit{espesor de la córnea al tiempo } t \; - \; \textit{espesor de la córnea al tiempo } t \; = \; 0}{\textit{espesor de la córnea al tiempo } t \; = \; 0} \right) \times 100$$

40. Se calcula el porcentaje medio de inflamación de la córnea de todos los ojos del ensayo a todos los tiempos de observación. A partir de la mayor puntuación media de inflamación de la córnea, observada a cualquiera de los tiempos seleccionados, se adjudica a cada sustancia problema una puntuación general de categoría.

41. La puntuación de la opacidad de la córnea se calcula utilizando el área de esta opacificada más densamente. Se calcula el valor medio de opacidad de la córnea de todos los ojos del ensayo a todos los tiempos de observación. A partir de la mayor puntuación media de opacidad de la córnea, observada a cualquiera de los tiempos seleccionados, se adjudica a cada sustancia problema una puntuación general de categoría (cuadro 1).

Cuadro 1

Puntuaciones de opacidad de la córnea

Puntuación	Observación
0	Sin opacidad
0,5	Opacidad muy débil
1	Zonas diseminadas o difusas; los detalles del iris se aprecian con claridad.
2	Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos.
3	Opacidad de la córnea intensa; no se ve ningún detalle preciso del iris; el tamaño de la pupila es apenas discernible.
4	Opacidad de la córnea completa; iris invisible

42. El valor medio de retención de fluoresceína de todos los ojos del ensayo se calcula solo al tiempo de observación de 30 minutos, y se utiliza para obtener la puntuación general de categoría asignada a cada sustancia problema (cuadro 2).

Cuadro 2

Puntuaciones de retención de fluoresceína

Puntuación	Observación
0	Sin retención de fluoresceína
0,5	Tinción muy débil de células aisladas
1	Tinción de células aisladas dispersas por toda el área tratada de la córnea
2	Tinción densa de células aisladas focalizada o confluente
3	Fluoresceína retenida en grandes áreas confluentes de la córnea

▼M2

43. Entre los efectos morfológicos figuran el «punteamiento» de las células del epitelio corneal, el «aflojamiento» del epitelio, la rugosidad «de la superficie corneal y el»«pegado» de la sustancia problema a la córnea. Estas observaciones pueden presentar una intensidad variable y darse simultáneamente. La clasificación de estas observaciones es subjetiva, según la interpretación del investigador.

DATOS E INFORME

Evaluación de los datos

44. Los resultados de la opacidad de la córnea, de la inflamación y de la retención de fluoresceína deben evaluarse por separado a fin de llegar a una clasificación ICE para cada parámetro. Las clases ICE de cada parámetro se combinan a continuación para generar una clasificación según la capacidad de irritación de cada sustancia problema.

Criterios de decisión

45. Una vez evaluado cada uno de los parámetros, pueden asignarse las clases ICE en función de unas bandas predeterminadas. La interpretación del espesor de la córnea (cuadro 3), la opacidad (cuadro 4), y la retención de fluoresceína (cuadro 5) utilizando cuatro clases ICE se efectúa según las siguientes escalas:

Cuadro 3

Criterios de clasificación ICE según el espesor de la córnea

Inflamación media de la córnea (%) (*)	Clase ICE
0 a 5	I
> 5 a 12	II
> 12 a 18 (> 75 min tras el tratamiento)	II
> 12 a 18 (≤ 75 min tras el tratamiento)	III
> 18 a 26	III
> 26 a 32 (> 75 min tras el tratamiento)	III
> 26 a 32 (≤ 75 min tras el tratamiento)	IV
> 32	IV

(*) Puntuaciones de inflamación de la córnea aplicables solo si el espesor se mide con un microscopio de lámpara de hendidura Haag-Streit BP900 con un medidor de profundidad nº I y una anchura de la hendidura ajustada a 9½, lo que equivale a 0,095 mm. Los usuarios deben tener en cuenta que los microscopios de lámpara de hendidura pueden dar diferentes mediciones del espesor de la córnea con diferentes ajustes de la anchura de la hendidura.

Cuadro 4

Criterios de clasificación ICE según la opacidad

Puntuación media de la opacidad máxima (*)	Clase ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Véase el cuadro 1.

▼M2

Cuadro 5

Criterios de clasificación ICE según la retención media de fluoresceína

Puntuación media de la recepción de fluoresceína a los 30 minutos tras el tratamiento (*)	Clase ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Véase el cuadro 2.

46. La clasificación general de capacidad de irritación *in vitro* de una sustancia problema se evalúa leyendo la clasificación de capacidad de irritación correspondiente a la combinación de categorías obtenidas con la inflamación de la córnea, la opacidad de esta y la retención de fluoresceína, y aplicando el esquema presentado en el cuadro 6.

Cuadro 6

Clasificación general de la capacidad de irritación *in vitro*

Clasificación	Combinaciones de los tres parámetros
Corrosivo / irritante intenso	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacidad de la córnea ≥ 3 a los 30 min (en al menos dos ojos) Opacidad de la córnea = 4 a cualquier tiempo (en al menos dos ojos) Aflojamiento intenso del epitelio (en al menos un ojo)

(*) Combinaciones menos probables.

47. Como se indica en el punto 1, si la sustancia problema no se identifica como corrosiva o irritante intensa para los ojos, deben realizarse otras pruebas con fines de clasificación y etiquetado. El método de ensayo ICE tiene una exactitud general del 83 % (120/144) al 87 % (134/154), una tasa de falsos positivos del 6 % (7/122) al 8 % (9/116), y una tasa de falsos negativos del 41 % (13/32) al 50 % (15/30) respecto a la detección de agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos, en relación con los datos obtenidos mediante el método de ensayo de ojos de conejo *in vivo*, clasificados según los sistemas de clasificación de la EPA (1), UE (2), o SGA (3). Si se excluyen de la base de datos las sustancias de ciertas clases químicas (es decir, alcoholes y agentes tensioactivos) y físicas (es decir, sólidos), la exactitud del método ICE en el conjunto de los sistemas de clasificación de la UE, EPA y SAE varía del 91 % (75/82) al 92 % (69/75), las tasas de falsos positivos van del 5 % (4/73) al 6 % (4/70), y las tasas de falsos negativos van del 29 % (2/7) al 33 % (3/9) (4).

48. Incluso aunque una sustancia problema no se clasifique como corrosiva o irritante intensa para los ojos, los datos del ICE pueden ser útiles, junto con los datos del ensayo *in vivo* con ojos de conejo o de otro ensayo *in vitro* validado adecuadamente, para seguir evaluando la utilidad y las limitaciones del método de ensayo ICE a efectos de la detección de agentes irritantes no intensos y agentes no irritantes (se está elaborando un documento de orientación sobre el uso de métodos de ensayo *in vitro* de la toxicidad ocular).

▼M2

Criterios de aceptación del estudio

49. Se considera que un ensayo es aceptable si los controles negativos o del vehículo/disolvente simultáneos y los controles positivos simultáneos reciben una clasificación de capacidad de irritación correspondiente a las clases de agentes no irritantes y de agentes irritantes intensos / corrosivos, respectivamente.

Informe del ensayo

50. El informe del ensayo debe incluir la siguiente información, en caso de que corresponda a la realización del estudio:

Sustancias problema y de control

Denominación o denominaciones químicas, como la denominación estructural utilizada por el Chemical Abstracts Service (CAS), seguida por otras denominaciones, si se conocen;

El número de registro CAS, si se conoce;

La pureza y la composición de la sustancia o mezcla (en porcentajes en peso), en la medida en que se disponga de esta información;

Propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio, como estado físico, volatilidad, pH, estabilidad, clase química o hidrosolubilidad;

Tratamiento de las sustancias problema y de control antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

Estabilidad, si se conoce.

Información referente al promotor y al laboratorio

Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

Identificación de la fuente de los ojos (es decir, instalación en la que se han recogido);

Condiciones de almacenamiento y transporte de los ojos (por ejemplo, fecha y hora de recogida de los ojos, plazo transcurrido hasta el inicio del ensayo);

Características específicas de los animales de los que se han extraído los ojos (por ejemplo, edad, sexo, peso del animal), si se dispone de estos datos.

Justificación del método de ensayo y del protocolo utilizados

Integridad del método de ensayo

Procedimiento utilizado para garantizar la integridad (es decir, la exactitud y la fiabilidad) del método de ensayo a lo largo del tiempo (por ejemplo, ensayo periódico de sustancias utilizadas para demostrar la aptitud, utilización de datos anteriores de controles negativos y positivos).

Criterios de aceptabilidad del ensayo

Cuando corresponda, bandas aceptables de controles de referencias simultáneos según los datos históricos.

Condiciones del ensayo

Descripción del sistema de ensayo utilizado;

Microscopio de lámpara de hendidura utilizado (por ejemplo, modelo);

Ajustes instrumentales del microscopio de lámpara de hendidura utilizado;

Información sobre los ojos de pollo utilizados, incluidas declaraciones sobre su calidad;

▼M2

Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;

Concentraciones utilizadas de la sustancia problema;

Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

Referencia a datos anteriores del modelo (por ejemplo, controles negativos y positivos, sustancias utilizadas para demostrar la aptitud, sustancias de referencia);

Descripción de los criterios de evaluación seguidos.

Resultados

Descripción de otros efectos observados;

En su caso, fotografías del ojo.

Discusión de los resultados

Conclusión

BIBLIOGRAFÍA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

(3) Naciones Unidas (2007). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), segunda edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2007. Disponible en:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_s.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible en la dirección:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión (DO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

(7) OCDE (2002). Directrices de ensayo TG 405. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Disponible en la dirección:

[http://www.oecd.org/document/40/0, 2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Disponible en la dirección:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible en la dirección:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Disponible en la dirección:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo.

Sustancias de referencia: Sustancias utilizadas como patrón para comparar con una sustancia problema. Las sustancias de referencia deben presentar las siguientes propiedades: a) un origen coherente y fiable; b) similitud estructural y funcional con la clase de sustancias problema; c) características físicas y químicas conocidas; c) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y e) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

Córnea: Parte transparente delantera del globo ocular que cubre el iris y la pupila y permite el paso de la luz al interior.

Opacidad de la córnea: Medida del grado de opacidad de la córnea tras su exposición a una sustancia problema. Un aumento de la opacidad de la córnea indica que esta ha sufrido una lesión.

Inflamación de la córnea: Medición objetiva en el ensayo ICE de la magnitud de la dilatación de la córnea tras su exposición a una sustancia problema. Se expresa en porcentaje y se calcula a partir de las mediciones del espesor de la córnea de referencia de base (antes de la administración de la sustancia) y de los espesores registrados a intervalos regulares tras la exposición a la sustancia problema en el ensayo ICE. El grado de inflamación de la córnea indica las lesiones que esta ha sufrido.

Categoría 1 de la EPA: Corrosión (destrucción irreversible del tejido ocular) o afectación o irritación de la córnea, persistente durante más de 21 días (1).

Categoría R41 de la UE: Producción de una lesión de los tejidos oculares o un deterioro físico importante de la visión, como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación (2).

Tasa de falsos negativos: Proporción de todas las sustancias positivas identificadas erróneamente como negativas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Tasa de falsos positivos: Proporción de todas las sustancias negativas identificadas erróneamente como positivas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

Retención de fluoresceína: Medición subjetiva en el ensayo ICE de la cantidad de fluoresceína sódica retenida por las células epiteliales de la córnea tras la exposición de esta a una sustancia problema. El grado de retención de fluoresceína indica las lesiones que ha sufrido el epitelio de la córnea.

SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos): Sistema que propone la clasificación de sustancias químicas y sus mezclas según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta a emergencias) y al medio ambiente (3).

▼M2

Categoría 1 del SGA: Producción de una lesión de los tejidos oculares o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación (3).

Peligro: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

Control negativo: Muestra paralela no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con sustancia problema y otras muestras de control para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

Sustancias no irritantes: Sustancias no clasificadas como irritantes oculares en las categorías I, II, o III de la EPA, en la categoría R41 o R36 de la UE, ni en las categorías 1, 2A o 2B del SGA (1) (2) (3).

Sustancias corrosivas oculares: a) Sustancias que provocan una lesión irreversible de los tejidos oculares; b) sustancias clasificadas como irritantes oculares de la categoría 1 del SGA, categoría I de la EPA, o categoría R41 de la UE (1) (2) (3).

Sustancias irritantes oculares: a) Sustancias que producen un cambio reversible en el ojo como consecuencia de su aplicación a la superficie anterior de este; b) sustancias clasificadas como irritantes oculares en las categorías II, o III de la EPA, categoría R36 de la UE, o en las categorías 2A o 2B del SGA (1) (2) (3).

Sustancias irritantes intensas oculares: a) Sustancias que provocan lesiones de los tejidos oculares como consecuencia de su aplicación en la superficie anterior del ojo, y que no se resuelven en los 21 días siguientes a la aplicación, o una degradación física severa de la visión; b) sustancias clasificadas como irritantes oculares de la categoría 1 del SGA, categoría I de la EPA, o categoría R41 de la UE (1) (2) (3).

Control positivo: Muestra paralela que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del control positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la intensidad de la respuesta.

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio o en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios.

Microscopio de lámpara de hendidura: Instrumento utilizado para examinar directamente el ojo con el aumento de un microscopio binocular creando una imagen estereoscópica en vertical. En el método de ensayo ICE, este instrumento se utiliza para ver las estructuras anteriores del ojo del pollo, así como para medir objetivamente el espesor de la córnea con ayuda de un medidor de profundidad.

Control del disolvente/vehículo: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con sustancia problema y otras muestras de control a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las muestras tratadas con la sustancia problema disuelta en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control negativo simultáneo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

▼**M2**

Ensayo gradual: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre una sustancia problema, siguiendo un orden especificado en un proceso de ponderación de los datos en cada fase, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar a la fase siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de una sustancia problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de una sustancia problema con la información disponible, se aplica un procedimiento secuencial de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación inequívoca.

Método de ensayo validado: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado puede tener un comportamiento insuficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto.

Ponderación de los datos: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de una sustancia.

▼**M2**

Apéndice 2

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA APTITUD DEL MÉTODO DE ENSAYO ICE

Antes de proceder al uso sistemático de un método de ensayo que se ajuste a este método de ensayo, es posible que los laboratorios deseen demostrar su aptitud técnica, identificando correctamente la clasificación de las diez sustancias recomendadas del cuadro 1 en cuanto a su corrosividad ocular. Estas sustancias se ha seleccionado para representar la gama de respuestas de irritación/corrosión ocular local, sobre la base de los resultados conseguidos en el ensayo con ojo de conejo *in vivo* (TG 405) (es decir, categorías 1, 2A, 2B o no clasificada o etiquetada según el SGA de la ONU (3) (7). Sin embargo, considerando la utilidad validada de estos ensayos (es decir, identificar solamente sustancias corrosivas/irritantes intensas oculares), solo hay dos resultados del ensayo a efectos de clasificación (sustancia corrosiva/irritante intensa o sustancia no corrosiva/no irritante intensa) para demostrar la aptitud del método. Otros criterios de selección son que las sustancias se encuentren en el mercado, que se disponga de datos de referencia *in vivo* de calidad, y que haya datos de calidad procedentes de los dos métodos *in vitro* para los que se están elaborando directrices de ensayo. Por este motivo, se han seleccionado sustancias irritantes de la lista recomendada por el ICCVAM de 122 sustancias de referencia para la validación de métodos de ensayo de la toxicidad ocular *in vitro* (véase el apéndice H: Lista de sustancias de referencia recomendadas por el ICCVAM) (4). Se encuentran datos de referencia en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM para el método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino (BCOP) y para el ICE (18) (19).

Cuadro 1

Sustancias recomendadas para demostrar la aptitud técnica con ICE

Productos químicos	Nº CAS	Clase química (1)	Estado físico	Clasificación (2) *in vivo*	Clasificación (3) *in vitro*
Cloruro de benzalconio (5 %)	8001-54-5	Compuesto onio	Líquido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Clorhexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, éster	Sólido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Imidazol	288-32-4	Heterociclo	Sólido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquido	Categoría 1	Corrosivo/irritante intenso
Cloruro de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Haluro de acilo	Líquido	Categoría 2A	No corrosivo/no irritante intenso
2-metil-acetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, éster	Líquido	Categoría 2B	No corrosivo/no irritante intenso
Nitrato de amonio	6484-52-2	Sal inorgánica	Sólido	Categoría 2A	No corrosivo/no irritante intenso

▼**M2**

Productos químicos	Nº CAS	Clase química (1)	Estado físico	Clasificación (2) *in vivo*	Clasificación (3) *in vitro*
Glicerol	56-81-5	Alcohol	Líquido	No etiquetado	No corrosivo/no irritante intenso
n-Hexano	110-54-3	Hidrocarburo (acíclico)	Líquido	No etiquetado	No corrosivo/no irritante intenso

Abreviaturas: Nº CAS: número de registro del Chemical Abstracts Service

(1) La clase química se ha asignado a cada sustancia problema utilizando un sistema de clasificación habitual, basado en el sistema de clasificación de materias médicas de la National Library of Medicine (MeSH) (se puede encontrar en la dirección http// www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE) y utilizando el SGA de la ONU (3) (7).

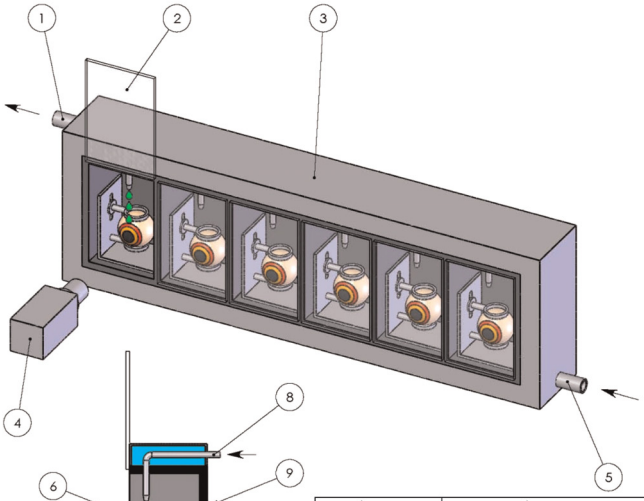
(3) Sobre la base de los resultados obtenidos con el método de ensayo BCOP y con el ICE.

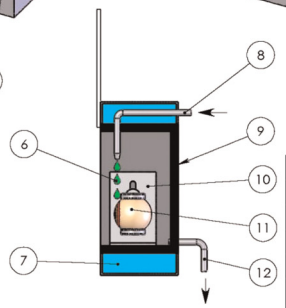
▼M2

Apéndice 3

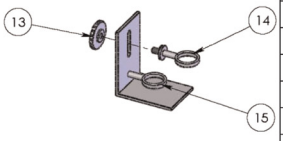
Diagramas del aparato de perfusión y del soporte para los ojos utilizados en el método ICE

(En Burton et al. (17) se encuentran otras descripciones genéricas del aparato de perfusión y del soporte para los ojos)





SECCIÓN DE UN COMPARTIMENTO



SOPORTE PARA EL OJO

NÚMERO	DESCRIPCIÓN
1	SALIDA DE AGUA CALIENTE
2	PUERTA CORREDERA
3	APARATO DE PERFUSIÓN
4	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN ÓPTICA
5	ENTRADA DE AGUA CALIENTE
6	SOLUCIÓN SALINA
7	AGUA CALIENTE
8	ENTRADA DE SOLUCIÓN SALINA
9	COMPARTIMENTO
10	SOPORTE PARA EL OJO
11	OJO DE POLLO
12	SALIDA DE SOLUCIÓN SALINA
13	TUERCA DE FIJACIÓN
14	BRAZO SUPERIOR AJUSTABLE
15	BRAZO INFERIOR FIJO

▼M3

B.49. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

INTRODUCCIÓN

1. El ensayo de micronúcleos *in vitro* (MNvit) es un ensayo de genotoxicidad para la detección de micronúcleos (MN) en el citoplasma de células en interfase. Los micronúcleos pueden proceder de fragmentos cromosómicos acéntricos (es decir, que carecen de centrómero) o de cromosomas completos que no pueden migrar a los polos durante la anafase de la división celular. El ensayo detecta la actividad de productos químicos clastogénicos y aneugénicos (sustancias y mezclas) (1) (2) en células que han sufrido la división celular durante la exposición a la sustancia problema o después de la misma. El presente método de ensayo (ME) permite el uso de protocolos con y sin citocalasina B (citoB), que es un inhibidor de la polimerización de la actina. La adición de citoB antes de la mitosis diana permite la identificación y el análisis selectivo de la frecuencia de micronúcleos en las células que han completado una sola mitosis porque dichas células son binucleadas (3) (4). Este ME permite también el uso de protocolos sin bloqueo de la citocinesis, siempre que haya pruebas de que la población celular analizada ha experimentado la mitosis.

2. Además de utilizar el ensayo de MNvit para identificar productos químicos (sustancias y mezclas) que inducen micronúcleos, el uso del bloqueo de la citocinesis, del etiquetado inmunoquímico de cinetocoros, o de la hibridación con sondas centroméricas o teloméricas [hibridación fluorescente *in situ* (FISH)] puede aportar también información sobre los mecanismos del daño cromosómico y de la formación de micronúcleos (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Los procedimientos de etiquetado e hibridación pueden utilizarse cuando hay un aumento en la formación de micronúcleos y el investigador desea determinar si el aumento es consecuencia de sucesos clastogénicos o aneugénicos.

3. Los micronúcleos representan un daño que se ha transmitido a las células hijas, mientras que las aberraciones cromosómicas registradas en las células en metafase pueden no transmitirse. Debido a que los micronúcleos de las células en interfase pueden evaluarse de forma relativamente objetiva, el personal de laboratorio solamente tiene que determinar si las células han sufrido o no la división y cuántas células contienen un micronúcleo. Como resultado, las preparaciones pueden evaluarse de forma relativamente rápida y el análisis puede automatizarse. Esto hace que sea factible evaluar miles en lugar de cientos de células por tratamiento, lo que aumenta el poder del ensayo. Finalmente, como los micronúcleos pueden derivarse de cromosomas retardados, existe la posibilidad de detectar agentes inductores de aneuploidía que son difíciles de estudiar en ensayos convencionales de aberraciones cromosómicas como, por ejemplo, la TG 473 de la OCDE (capítulo B.10 del presente anexo) (17). Sin embargo, el ensayo de MNvit no permite diferenciar las sustancias que inducen poliploidía de las que inducen efectos clastogénicos sin recurrir a técnicas especiales como la FISH mencionada en el punto 2.

4. El ensayo de MNvit es un método *in vitro* que utiliza normalmente células cultivadas de roedor o humanas. Proporciona una base general para investigar el potencial de causar daño cromosómico*in vitro* porque permite detectar tanto anéugenos como clastógenos.

5. El ensayo de MNvit es sólido y efectivo con una diversidad de tipos celulares, y tanto en presencia como en ausencia de citoB. Hay muchos datos que apoyan la validez del ensayo de MNvit con diversas líneas celulares de roedor (CHO, V79, CHL/IU y L5178Y) y con linfocitos humanos (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Aquí se incluyen, en particular, los estudios internacionales de validación coordinados por la Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) y los informes del International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Los datos disponibles también se han vuelto

▼M3

a evaluar en un estudio de validación retrospectiva con ponderación de los datos, por parte del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) de la Comisión Europea, y el método de ensayo ha sido avalado en cuanto a su validez científica por el Comité científico consultivo del CEVMA (ESAC) (32) (33) (34). Se ha descrito el uso de la línea celular linfoblastoide humana TK6 (35), de células HepG2 (36) (37) y de células primarias de embrión de hámster sirio (38), aunque no se han utilizado en los estudios de validación.

DEFINICIONES

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES

7. Los ensayos realizados *in vitro* suelen exigir la utilización de una fuente exógena de activación metabólica, salvo que las células sean competentes metabólicamente respecto a las sustancias que se ensayan. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*. Debe procurarse también evitar las circunstancias que puedan conducir a resultados falsos positivos que no reflejen la mutagenicidad intrínseca y que puedan deberse a factores tales como cambios en el pH o en la osmolalidad, o a altos niveles de citotoxicidad (39) (40) (41). Si la sustancia problema provoca un cambio en el pH del medio en el momento de su incorporación, hay que ajustar el pH, preferentemente amortiguando la solución madre de forma que todos los volúmenes en todas las concentraciones de ensayo, y respecto a todos los controles, se mantengan iguales.

8. Para analizar la inducción de la formación de micronúcleos, es fundamental que haya habido mitosis en los cultivos tanto tratados como sin tratar. La fase que proporciona más información para evaluar la formación de micronúcleos es la de las células que han completado una sola mitosis durante el tratamiento con la sustancia problema, o después de este tratamiento.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

9. Los cultivos celulares de origen humano o de mamífero se exponen a la sustancia problema tanto con una fuente exógena de activación metabólica como sin ella, salvo que se utilicen células con una capacidad adecuada de metabolización. En todos los ensayos se incluyen un control positivo (CP) y un control del disolvente o vehículo (CV) en paralelo.

10. Durante la exposición a la sustancia problema, o después de la misma, las células se cultivan durante un tiempo suficiente para que el daño cromosómico o del huso acromático provoquen la formación de micronúcleos en las células en interfase. Para la inducción de aneuploidía, es necesario normalmente que la sustancia problema esté presente durante la mitosis. Las células en interfase se recogen, se tiñen y se analizan para detectar la presencia de micronúcleos. Lo ideal es que los micronúcleos se evalúen solamente en las células que hayan completado la mitosis durante la exposición a la sustancia problema o durante el período tras la exposición, en su caso. En los cultivos que se hayan tratado con un bloqueante de la citocinesis, esto se consigue evaluando únicamente las células binucleadas. En ausencia de bloqueante de la citocinesis es importante demostrar la probabilidad de que las células analizadas hayan experimentado la división celular durante la exposición a la sustancia problema o después de dicha exposición. En relación con todos los protocolos, es importante demostrar que ha habido proliferación celular en los cultivos tanto tratados como de control, y el grado de citotoxicidad o citostasis inducido por la sustancia problema debe estimarse en los cultivos (o en cultivos paralelos) que se examinan para evaluar la presencia de micronúcleos en ellos.

▼M3

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Preparativos

11. Pueden utilizarse cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana (5) (19) (42) (43) y una serie de líneas celulares de roedor, tales como CHO, V79, CHL/IU, y L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). El uso de otros tipos y líneas celulares debe justificarse por la demostración de su comportamiento en el ensayo, como se describe en la sección de criterios de aceptabilidad. Como la frecuencia espontánea de la formación de micronúcleos influye en la sensibilidad del ensayo, se recomienda la utilización de tipos celulares con una frecuencia espontánea de micronúcleos que sea baja y estable.

12. Los linfocitos de sangre periférica humana deben obtenerse de individuos no fumadores, sanos, jóvenes (de entre 18 y 35 años de edad, aproximadamente), que no hayan estado expuestos recientemente a radiaciones ni a sustancias genotóxicas conocidas. Si se combinan las células procedentes de más de un donante, debe especificarse el número de donantes. La frecuencia de micronúcleos aumenta con la edad y esta tendencia es más pronunciada en las mujeres que en los varones (44), lo que debe tenerse en cuenta al efectuar la selección de las células de los donantes para su combinación.

Medios y condiciones de cultivo

13. Para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación (recipientes de cultivo, concentración de CO_2, temperatura y humedad) adecuados. Las cepas y líneas celulares establecidas deben examinarse sistemáticamente para comprobar la estabilidad del número modal de cromosomas y la ausencia de contaminación por micoplasmas, y deben dejar de utilizarse si se contaminan o si hay un cambio en el número modal de cromosomas. Debe conocerse la duración del ciclo celular normal en las condiciones de cultivo aplicadas en el laboratorio de ensayo. Si se utiliza el método de bloqueo de la citocinesis, la concentración del inhibidor de la citocinesis debe optimizarse para el tipo de células específico que se utilice y debe demostrarse que proporciona un buen rendimiento de células binucleadas para la evaluación.

Preparación de los cultivos

14. Cepas y líneas celulares establecidas: las células se propagan a partir de cultivos madre, se siembran en medio de cultivo a una densidad tal que los cultivos no lleguen a confluir en monocapas, y los cultivos en suspensión no alcancen una densidad excesiva antes del momento de la recogida, y se incuban a 37 °C.

15. Linfocitos: se cultiva sangre completa tratada con un anticoagulante (por ejemplo, heparina), o bien linfocitos aislados, en presencia de un mitógeno [por ejemplo, fitohemaglutinina (PHA)] antes de la exposición a la sustancia problema y a la citoB.

Activación metabólica

16. Se debe recurrir a sistemas de metabolización exógenos cuando se utilizan células con una capacidad metabólica endógena inadecuada. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (45) (46) o una combinación de fenobarbital y β-naftoflavona (46) (47) (48) (49). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (50) ni el Reglamento (CE) nº 850/2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes (66), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir las oxidasas de función mixta (46) (47) (48) (49). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. La elección de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase de sustancia que se estudia y, en algunos casos, puede ser adecuado utilizar más de una concentración de S9.

▼M3

17. Las líneas celulares genéticamente modificadas que expresan enzimas de activación, humanas o de roedores, pueden suprimir la necesidad de utilizar un sistema de activación metabólica exógeno, y pueden utilizarse como células de ensayo. En estos casos, la elección de las líneas celulares utilizadas debe justificarse científicamente, por ejemplo, por la pertinencia de las oxidasas de función mixta para el metabolismo de la sustancia problema (51), y por su capacidad de respuesta a clastógenos y aneúgenos conocidos (véase la sección sobre criterios de aceptabilidad). Debe reconocerse que la sustancia estudiada puede no ser metabolizada por la oxidasa u oxidasas de función mixta expresadas; en este caso, los resultados negativos no indicarían que la sustancia problema no puede inducir micronúcleos.

Preparación de la sustancia problema

18. Las sustancias sólidas deben disolverse en disolventes o vehículos adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células. Las sustancias líquidas pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento. Las sustancias gaseosas o volátiles deben ensayarse aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes sellados (52) (53). Han de emplearse soluciones de la sustancia problema recién preparadas, salvo que los datos relativos a la estabilidad demuestren que es posible su conservación.

Condiciones del ensayo

Disolvente o vehículo

19. El disolvente o vehículo no debe reaccionar con la sustancia problema ni ser incompatible con la supervivencia de las células ni con el mantenimiento de la actividad de la fracción S9 a la concentración utilizada. Para utilizar algún disolvente o vehículo distinto de los bien establecidos (por ejemplo, agua, medio de cultivo celular, dimetilsulfóxido), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con la sustancia problema y su ausencia de toxicidad genética. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

Utilización de citoB como bloqueante de la citocinesis

20. Una de las consideraciones más importantes en la realización del ensayo de MNvit es la de velar por que las células que se examinen hayan completado la mitosis durante el tratamiento o en el período de incubación tras el mismo, en su caso. La citoB es el agente más ampliamente utilizado para bloquear la citocinesis, ya que inhibe el ensamblaje de la actina, con lo que impide la separación de las células hijas tras la mitosis, y así se forman células binucleadas (5) (54) (55). Así pues, el recuento de micronúcleos puede limitarse a las células que han experimentado la mitosis durante el tratamiento o después de este. El efecto de la sustancia problema sobre la cinética de la proliferación celular puede medirse simultáneamente. La citoB debe utilizarse como bloqueante de la citocinesis cuando se utilizan linfocitos humanos, ya que la duración de los ciclos celulares es variable dentro de los cultivos y entre los donantes, y debido a que no todos los linfocitos responden a la PHA. Al examinar líneas celulares, se han utilizado otros métodos para determinar si las células que se evalúan han experimentado la división; estos métodos se consideran más abajo (véase el punto 26).

21. El laboratorio debe determinar la concentración adecuada de citoB para cada tipo de células con el fin de conseguir la frecuencia óptima de células binucleadas en los cultivos de control del disolvente o vehículo. La concentración adecuada de citoB está generalmente entre 3 y 6 μg/ml.

▼M3

Medición de la proliferación celular y de la citotoxicidad, y selección de las concentraciones de exposición

22. Cuando se determina la concentración máxima de sustancia problema que se va a estudiar, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas falsas, tales como las provocadas por una citotoxicidad excesiva, precipitación en el medio de cultivo, y cambios fuertes del pH o de la osmolalidad (39) (40) (41).

23. Se mide la proliferación celular para asegurarse de que las células tratadas han efectuado una mitosis durante el ensayo y de que los tratamientos se efectúan a los niveles adecuados de citotoxicidad (véase el punto 29). La citotoxicidad debe determinarse con y sin activación metabólica en las células que requieren activación metabólica, utilizando el aumento relativo del recuento de células (ARRC) o la duplicación relativa de la población (DRP) (véanse las fórmulas en el apéndice 2), salvo que se emplee la citoB. Cuando se emplea esta sustancia, es posible determinar la citotoxicidad utilizando el índice de replicación (IR) (véase la fórmula en el apéndice 2).

24. El tratamiento de los cultivos con citoB, junto con la medición de las frecuencias relativas de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas en el cultivo, constituye un método exacto de cuantificación del efecto sobre la proliferación celular y de la actividad citotóxica o citostática de un tratamiento (5), y garantiza que solamente se evalúan las células que se han dividido durante el tratamiento o después de este.

25. En los estudios con citoB, la citostasis o la citotoxicidad pueden cuantificarse mediante el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) (5) (26) (56), o pueden derivarse del IR de, al menos, 500 células por cultivo (véanse las fórmulas en el apéndice 2). Cuando se utiliza la citoB para evaluar la proliferación celular, hay que determinar el IPBC o el IR basándose en un mínimo de 500 células por cultivo. Estas mediciones, entre otras, pueden utilizarse para estimar la citotoxicidad comparando los valores obtenidos con los cultivos tratados y con los controles. La evaluación de otros indicadores de citotoxicidad (por ejemplo, confluencia, número de células, apoptosis, necrosis, recuento de las células en metafase) puede aportar información útil.

26. En los estudios sin citoB, es necesario demostrar que las células evaluadas en el cultivo se han dividido durante el tratamiento con la sustancia problema o tras este tratamiento; en caso contrario, pueden obtenerse respuestas negativas falsas. Entre los métodos que se han utilizado para garantizar que las células objeto de evaluación se han dividido figuran los siguientes: la incorporación y posterior detección de bromodesoxiuridina (BrdU) para identificar las células que se han replicado (57), la formación de clones cuando se tratan células de líneas celulares permanentes y se evalúan *in situ* en el portaobjetos de un microscopio [índice de proliferación (IP)] (25) (26) (27) (28), o la medición de la duplicación relativa de la población (DRP) o del aumento relativo del recuento de células (ARRC) u otros métodos comprobados (16) (56) (58) (59) (véanse las fórmulas en el apéndice 2). La evaluación de otros indicadores de citotoxicidad o de la citostasis (por ejemplo, confluencia, número de células, apoptosis, necrosis, recuento de las células en metafase) puede aportar información útil.

27. Deben evaluarse al menos tres concentraciones de ensayo analizables. Con este fin, puede ser necesario realizar el experimento utilizando un número mayor de concentraciones próximas entre sí y analizar la formación de micronúcleos en las concentraciones que aporten el rango apropiado de citotoxicidades. Otra estrategia posible consiste en efectuar un ensayo preliminar de citotoxicidad a fin de estrechar el rango para el ensayo definitivo.

28. El objetivo es que la concentración máxima provoque una citotoxicidad del 55 ± 5 %. Unos niveles más elevados podrían inducir daño cromosómico como efecto secundario de la citotoxicidad (60). Cuando se produce citotoxicidad, las concentraciones de ensayo seleccionadas deben cubrir un rango que vaya desde la que provoca una citotoxicidad del 55 ± 5 % hasta la que no provoca citotoxicidad o solo débilmente.

▼M3

29. Si no se observa citotoxicidad ni precipitado, la concentración de ensayo máxima debe corresponder a la más baja del grupo siguiente: 0,01 M, 5 mg/mL o 5 µl/mL. Las concentraciones seleccionadas para el análisis no deben estar separadas, en general, por un factor de más de 10. En el caso de sustancias problema que muestran una curva de concentración-respuesta de gran pendiente, puede ser necesario reducir más la separación entre las concentraciones de la sustancia problema, de forma que se evalúen cultivos en los rangos de toxicidad moderada y baja.

30. En caso de que la solubilidad constituya un factor limitante, la concentración máxima, si no está limitada por la citotoxicidad, debe ser la concentración más baja a la que un precipitado mínimo es visible en los cultivos, siempre que esto no interfiera con el recuento. La valoración de la precipitación debe realizarse con métodos como la microscopia óptica, anotando el precipitado que persiste, o el que aparece durante el cultivo (hacia el final del tratamiento).

Controles

31. En todos los experimentos deben incluirse controles positivos (CP) y del disolvente o vehículo en paralelo, con y sin activación metabólica.

32. Los CP son necesarios para demostrar la capacidad de las células utilizadas y del protocolo de ensayo para identificar clastógenos y aneúgenos, ►C1 y confirmar la actividad metabólica de la preparación de S9. ◄ Los CP deben emplear inductores conocidos de la formación de micronúcleos a concentraciones a las que se prevea que se van a obtener aumentos pequeños, pero reproducibles, sobre la frecuencia espontánea, y demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo. Las concentraciones de los CP deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados.

33. Debe utilizarse un clastógeno que requiera activación metabólica (por ejemplo, ciclofosfamida, benzo[a]pireno) para demostrar tanto la competencia metabólica como la capacidad del sistema de ensayo para detectar clastógenos. Si está justificado, pueden utilizarse otros CP. Debido a que algunos CP que necesitan activación metabólica pueden ser activos sin activación metabólica exógena en ciertas condiciones de tratamiento o en ciertas líneas celulares, la necesidad de activación metabólica y la actividad de la preparación de S9 deben probarse en la línea celular seleccionada y a las concentraciones seleccionadas.

34. Por el momento, no se conoce ningún aneúgeno que necesite activación metabólica para su actividad genotóxica (16). Como ejemplos de CP aceptados actualmente para la actividad aneugénica pueden citarse la colchicina y la vimblastina. Pueden utilizarse otras sustancias si inducen micronúcleos solamente, o principalmente, a través de su actividad aneugénica. Para evitar tener que recurrir a dos CP (para la clastogenicidad y para la aneugenicidad) sin activación metabólica, el control de aneugenicidad puede servir como CP sin S9, y el control de clastogenicidad puede utilizarse para comprobar la idoneidad del sistema de activación metabólica utilizado. En células que no requieren S9 deben utilizarse CP tanto para la clastogenicidad como para la aneugenicidad. En el apéndice 3 se recogen los CP sugeridos.

35. Puede considerarse la utilización de un CP en función de las clases químicas, si se dispone de sustancias adecuadas. Todos los CP utilizados deben ser adecuados para el tipo de células y para las condiciones de activación.

▼M3

36. Deben incluirse controles del disolvente o vehículo para cada tiempo de recogida. Se realizarán asimismo controles negativos (CN) sin tratar (sin disolvente ni vehículo), salvo que exista información publicada o datos de los controles históricos del laboratorio que demuestre que, a las concentraciones utilizadas, el disolvente elegido no provoca efectos genotóxicos ni otro tipo de efectos nocivos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Pauta de tratamiento

37. Para maximizar la probabilidad de detectar un anéugeno o un clastógeno que actúe en una fase específica del ciclo celular, es importante que se trate con la sustancia problema un número suficiente de células en todas las fases de su ciclo celular. Por tanto, es posible que la pauta de tratamiento de líneas celulares y de cultivos celulares primarios difiera en algunos aspectos de la aplicada a los linfocitos, que requieren estimulación mitogénica para empezar su ciclo celular; este tema se trata en los puntos 41 a 43 (16).

38. Una serie de consideraciones teóricas, junto con datos publicados (18), indica que la mayoría de los anéugenos y clastógenos se detectan con un corto período de tratamiento, de entre 3 y 6 horas en presencia y ausencia de S9, seguido de la eliminación de la sustancia problema y de un período de crecimiento de entre 1,5 y 2,0 ciclos celulares (6). Las células se recogen a un tiempo equivalente a unas 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal (es decir, sin tratamiento), bien tras el inicio o bien al final del tratamiento (véase el cuadro 1). Los tiempos de la toma de muestras o los de recuperación pueden ampliarse si se sabe o se sospecha que la sustancia problema afecta a la duración del ciclo celular (por ejemplo, cuando se someten a ensayo análogos de nucleósidos).

39. Debido a la posible citotoxicidad de las preparaciones de S9 para las células de mamífero cultivadas, se aplica un tratamiento con exposición prolongada de 1,5-2,0 ciclos celulares normales solamente en ausencia de S9. En el tratamiento prolongado, se ofrecen opciones que permiten el tratamiento de las células con la sustancia problema en ausencia y en presencia de citoB. Estas opciones se refieren a situaciones en que puede haber preocupación respecto a posibles interacciones entre la sustancia problema y la citoB.

40. Las pautas sugeridas de tratamiento de las células se presentan en el cuadro 1. Estas pautas generales de tratamiento pueden modificarse en función de la estabilidad o reactividad de la sustancia problema o de las características particulares de crecimiento de las células utilizadas. Todos los tratamientos deben iniciarse y terminarse mientras las células están en la fase de crecimiento exponencial. Estas pautas se presentan con más detalle en los puntos 41 a 47 siguientes.

Cuadro 1

Tratamiento de las células y tiempos de recogida para el ensayo de MNvit

Linfocitos, células primarias y líneas celulares tratadas con citoB	+ S9	Tratar durante 3-6 horas en presencia de S9; retirar la fracción S9 y el medio de tratamiento; añadir medio fresco y citoB; recoger cuando hayan pasado 1,5-2,0 ciclos celulares normales.
	– S9 Exposición corta	Tratar durante 3-6 horas; retirar el medio de tratamiento; añadir medio fresco y citoB; recoger cuando hayan pasado 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

▼M3

	– S9 Exposición prolongada	*Opción A:* Tratar durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales en presencia de citoB; recoger al final del período de exposición. *Opción B:* Tratar durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales; retirar la sustancia problema; añadir medio fresco y citoB; recoger cuando hayan pasado 1,5-2,0 ciclos celulares normales.
Líneas celulares tratadas sin citoB (Igual que las pautas de tratamiento indicadas más arriba, salvo que no se añade citoB)		

Linfocitos, células primarias y líneas celulares tratadas con citoB

41. En el caso de los linfocitos, el enfoque más eficiente es iniciar la exposición a la sustancia problema a las 44-48 horas de la estimulación con PHA, cuando la sincronización del ciclo habrá desaparecido (5). En el ensayo inicial, se tratan las células durante 3 a 6 horas con la sustancia problema en ausencia y en presencia de S9. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco que contiene citoB, y las células se recogen cuando ha pasado un tiempo equivalente a 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

42. Si ambos ensayos iniciales de tratamiento corto (3-6 horas) son negativos o dudosos, se aplica un tratamiento posterior con exposición prolongada sin S9. Se dispone de dos opciones de tratamiento, que son igualmente aceptables. Sin embargo, podría ser más adecuado seguir la opción A en caso de linfocitos estimulados en que el crecimiento exponencial podría declinar a las 96 horas de la estimulación. Asimismo, los cultivos de células no deben haber alcanzado la confluencia en el momento del muestreo final en la opción B.

— Opción A: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales, y se recogen al final del período de tratamiento.

— Opción B: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco, y las células se recogen cuando han pasado otros 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

43. Las células primarias y las líneas celulares deben tratarse de forma similar a los linfocitos, salvo que no es necesario estimularlas con PHA durante 44-48 horas. Las células distintas de los linfocitos deben exponerse de forma tal que, al final del estudio, las células estén aún en fase de crecimiento logarítmico.

Líneas celulares tratadas sin citoB

44. Las células deben tratarse durante 3-6 horas en presencia y en ausencia de S9. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco, y las células se recogen al cabo de un tiempo equivalente a 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

▼M3

45. Si ambos ensayos iniciales de tratamiento corto (3-6 horas) son negativos o dudosos, se aplica un tratamiento posterior con exposición prolongada (sin S9). Se dispone de dos opciones de tratamiento, que son igualmente aceptables.

— Opción A: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales, y se recogen al final del período de tratamiento.

— Opción B: Las células se tratan con la sustancia problema durante 1,5-2,0 ciclos celulares normales. El medio de tratamiento se retira y se sustituye con medio fresco, y las células se recogen cuando han pasado otros 1,5-2,0 ciclos celulares normales.

46. En las monocapas, es posible que haya células mitóticas (identificables por su forma redondeada y por despegarse de la superficie) al final del tratamiento de 3-6 horas. Como las células mitóticas se despegan con facilidad, pueden perderse cuando se retira el medio que contiene la sustancia problema. Debe procurarse recogerlas cuando se lavan los cultivos, y devolverlas a estos, para evitar la pérdida de células en mitosis, y que podrían presentar micronúcleos, en el momento de la recogida final.

Número de cultivos

47. Los cultivos deben hacerse por duplicado con cada concentración de la sustancia problema y en el caso de los cultivos del vehículo o disolvente y del CN. Si se puede demostrar, sobre la base de datos históricos del laboratorio, que la diferencia entre los cultivos duplicados es mínima, cabe la posibilidad de que resulte aceptable un cultivo único. Si se utilizan cultivos únicos, se recomienda que se analice un número mayor de concentraciones.

Recogida de las células y preparación de los portaobjetos

48. Cada cultivo se recoge y se manipula por separado. La preparación de las células puede implicar un tratamiento hipotónico, pero esta fase no es necesaria si se consigue de otra manera una extensión adecuada de las células. Pueden usarse distintas técnicas para la preparación de los portaobjetos, siempre que lleven a la obtención de preparaciones celulares de buena calidad para su evaluación. Debe conservarse el citoplasma celular para poder detectar los micronúcleos y también (si se aplica el método de bloqueo de la citocinesis) identificar de forma fiable las células binucleadas.

49. Las preparaciones pueden teñirse siguiendo varios métodos, tales como la tinción de Giemsa o la aplicación de colorantes fluorescentes específicos del ADN (59). Si se emplea un colorante específico del ADN [por ejemplo, naranja de acridina (61) o Hoechst 33258 más pironina-Y (62)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN. Si resulta interesante obtener información sobre los mecanismos implicados en su formación, para identificar el contenido (cromosoma o fragmento cromosómico) de los micronúcleos pueden utilizarse anticuerpos anti-cinetocoro, la técnica FISH con sondas pancentroméricas de ADN o el etiquetado *in situ* del cebado con cebadores pancentroméricos específicos, junto con una tinción de contraste adecuada del ADN (15) (16). Pueden utilizarse otros métodos para diferenciar entre clastógenos y aneúgenos, siempre que se haya comprobado que son eficaces.

Análisis

50. Antes de analizarlos al microscopio, se asigna un código independiente a todos los portaobjetos, incluidos los del disolvente o vehículo y los de los controles. Otra posibilidad es analizar las muestras codificadas utilizando un sistema automático de análisis de imágenes o citometría de flujo que esté validado.

▼M3

51. En los cultivos tratados con citoB, deben analizarse las frecuencias de los micronúcleos en al menos 2 000 células binucleadas por cada concentración (al menos 1 000 células binucleadas por cultivo y dos cultivos por concentración). Si se utilizan cultivos únicos, deben evaluarse al menos 2 000 células binucleadas por concentración de cada cultivo. Si para la evaluación a cada concentración se dispone de un número sustancialmente inferior a 1 000 de células binucleadas por cultivo, o a 2 000 si se utiliza un cultivo único, y si no se detecta un aumento significativo de micronúcleos, debe repetirse el ensayo utilizando más células, o a concentraciones menos tóxicas, según sea más conveniente. Ha de procurarse no tener en cuenta para la evaluación las células binucleadas con formas irregulares o en las que los dos núcleos difieran mucho por su tamaño; tampoco deben confundirse las células binucleadas con células multinucleadas mal extendidas. Las células que contengan más de dos núcleos principales no deben tenerse en cuenta para el análisis de micronúcleos, ya que la frecuencia espontánea de micronúcleos puede ser más elevada en estas células (63) (64). Puede aceptarse incluir en la evaluación las células mononucleadas si se demuestra que la sustancia problema interfiere con la actividad de la citoB.

52. En las líneas celulares sometidas a ensayo sin tratamiento con citoB, debe evaluarse la presencia de micronúcleos en al menos 2 000 células por concentración (al menos 1 000 células por cultivo y dos cultivos por concentración). Cuando se utilice un cultivo único por concentración, se evaluarán al menos 2 000 células de cada cultivo.

53. Cuando se utiliza la citoB, para evaluar la proliferación celular hay que determinar el IPBC o el IR (véase el apéndice 2) basándose en un mínimo de 500 células por cultivo. Cuando se hacen los tratamientos en ausencia de citoB, es fundamental aportar pruebas de que las células que se están considerando han proliferado, como se indica en los puntos 24 a 27.

Criterios de aceptabilidad

54. Los laboratorios que se propongan utilizar el ensayo de MNvit descrito en el presente ME deben demostrar su capacidad de detectar de forma fiable y exacta las sustancias de actividad aneugénica y clastogénica conocida, con y sin activación metabólica, así como las que se sabe que son negativas, utilizando las sustancias de referencia del apéndice 3. Para demostrar su capacidad de aplicar el presente ME correctamente, el laboratorio debe aportar pruebas de que las células que se evalúan para la formación de micronúcleos han completado una sola división nuclear si el ensayo se lleva a cabo sin utilizar citoB.

55. Se recomienda utilizar las sustancias del apéndice 3·como sustancias de referencia. Pueden incluirse otras sustancias en lugar de las de la lista, o además de ellas, si se conoce su actividad y si inducen la formación de micronúcleos por los mismos mecanismos de acción, y si se demuestra que son pertinentes para las sustancias que se van a ensayar con el procedimiento de MNvit. La justificación podría incluir un estudio de validación en que se haya utilizado una amplia variedad de sustancias o que se haya centrado en un espectro más reducido basado en la clase química de la sustancia problema o en el mecanismo del daño que se estudie.

56. El control del disolvente o vehículo y los cultivos sin tratar deben mostrar de forma reproducible unas frecuencias bajas y consistentes de micronúcleos (normalmente, 5-25 micronúcleos/1 000 células para los tipos de células señalados en el punto 11). Es posible que otros tipos de células tengan diferentes rangos de respuestas, las cuales deben determinarse cuando se validen para su utilización en el ensayo de MNvit. Deben utilizarse los datos del CN, del disolvente y del CP para establecer los rangos de los controles históricos. Estos valores deben utilizarse en la toma de decisiones sobre la idoneidad de los CN o CP en paralelo para un experimento.

▼M3

57. Si se proponen para el ensayo cambios en el protocolo que sean de poca importancia (por ejemplo, uso de técnicas de recuento automáticas en vez de manuales, uso de un nuevo tipo de células), será necesario demostrar la efectividad del cambio antes de que se pueda considerar que es aceptable la utilización del protocolo modificado. La demostración de la efectividad incluye la demostración de que pueden detectarse los principales mecanismos de rotura cromosómica y ganancia o pérdida de cromosomas, y de que pueden obtenerse resultados positivos y negativos apropiados para la clase de cada sustancia, o para la amplia gama de sustancias, que se van a ensayar.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

58. Si se utiliza la técnica de bloqueo de la citocinesis, para la evaluación de la inducción de micronúcleos se emplearán solo las frecuencias de las células binucleadas con micronúcleos (independientemente del número de micronúcleos por célula). El tener en cuenta para la evaluación cuántas células tienen uno, dos o más micronúcleos puede aportar información útil, pero no es obligatorio.

59. También deben medirse en paralelo la citotoxicidad o la citostasis para todos los cultivos tratados y los de control del disolvente o vehículo (58). Los valores del IPBC y del IR deben calcularse para todos los cultivos tratados y de control, como medidas de retraso del ciclo celular cuando se utiliza el método de bloqueo de la citocinesis. En ausencia de citoB, debe utilizarse la DRP o el ARRC o el IP (véase el apéndice 2).

60. Deben proporcionarse datos de cada cultivo. Además, se resumirán todos los datos en forma de cuadro.

61. Las sustancias que inducen micronúcleos en el ensayo de MNvit pueden deber esta propiedad a su capacidad de inducir rotura cromosómica, pérdida de cromosomas, o una combinación de ambas. Para determinar si el mecanismo de inducción de micronúcleos se debe a actividad clastogénica y/o aneugénica, pueden realizarse análisis más detallados utilizando anticuerpos anti-cinetocoro, sondas *in situ* específicas del centrómero, u otros métodos.

Evaluación e interpretación de los resultados

62. No se requiere ninguna verificación mediante ensayos adicionales en caso de una respuesta positiva o negativa clara. Los resultados dudosos pueden aclararse mediante el análisis de otras 1 000 células procedentes de todos los cultivos, para mantener el carácter ciego del ensayo. Si con este enfoque no se resuelve el resultado, deben efectuarse más ensayos. En los siguientes experimentos se considerará la posibilidad de modificar los parámetros del estudio en una gama de condiciones ampliada o restringida, según proceda. Entre los parámetros del estudio que podrían modificarse figuran el espaciado entre las concentraciones del ensayo, los períodos de tratamiento y de recogida de las células, o las condiciones de activación metabólica.

63. Son varios los criterios para determinar un resultado positivo, tales como un aumento relacionado con la concentración o un aumento estadísticamente significativo del número de células que presentan micronúcleos. Debe considerarse en primer lugar la importancia biológica de los resultados. Para la evaluación de la significación biológica de la respuesta puede servir de orientación considerar si los valores observados se encuentran dentro o fuera del rango del control histórico. Pueden emplearse métodos estadísticos adecuados como apoyo para evaluar los resultados del ensayo (65). Sin embargo, los resultados de las pruebas estadísticas deben evaluarse respecto a la relación dosis-respuesta. También deben tenerse en cuenta la reproducibilidad y los datos históricos.

▼M3

64. Si bien en la mayoría de los experimentos los resultados serán claramente positivos o negativos, en algunos casos el conjunto de datos no permitirá emitir un juicio definitivo sobre la actividad de la sustancia problema. Estas respuestas dudosas o cuestionables pueden darse con independencia del número de veces que se repita el experimento.

65. Un resultado positivo en el ensayo de MNvit indica que la sustancia problema induce roturas cromosómicas o pérdida de cromosomas en células de mamífero cultivadas. Un resultado negativo indica que, en las condiciones en que se realiza el ensayo, la sustancia problema no induce roturas cromosómicas ni pérdida o ganancia de cromosomas en las células de mamífero cultivadas.

Informe del ensayo

66. El informe del ensayo debe incluir como mínimo la siguiente información, si es importante para la realización del estudio:

Sustancia problema:

— datos de identificación y número de registro del Chemical Abstracts Service y número CE,

— naturaleza física y pureza,

— propiedades físico-químicas importantes para la realización del estudio,

— reactividad de la sustancia problema con el disolvente o vehículo o con el medio de cultivo de las células.

Disolvente o vehículo:

— justificación de la elección del disolvente o vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en el disolvente o vehículo.

Células:

— tipo y procedencia de las células utilizadas,

— idoneidad del tipo de células utilizado,

— ausencia de micoplasmas, si procede,

— información sobre la duración del ciclo celular, tiempo de duplicación o índice de proliferación,

— en caso de que se utilicen linfocitos, indicación del sexo, edad, y número de los donantes de sangre, si procede,

— en caso de que se utilicen linfocitos, si lo que se expone a la sustancia es la sangre completa o son los linfocitos aislados,

— número de pases, si procede,

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares, si procede,

— número modal de cromosomas,

— duración del ciclo celular normal (control negativo).

Condiciones del ensayo:

— identidad de la sustancia de bloqueo de la citocinesis (por ejemplo, citoB), si se utiliza, y su concentración, junto con la duración de la exposición de las células,

— justificación de la selección de las concentraciones y del número de cultivos, incluidos los datos de citotoxicidad y los límites de solubilidad, si se dispone de ellos,

— composición del medio, concentración de CO_2, si procede,

— concentraciones de la sustancia problema,

▼**M3**

— concentración (y volumen) del vehículo y de la sustancia problema añadidos,

— temperatura y duración de la incubación,

— duración del tratamiento,

— momento de la recogida tras el tratamiento,

— densidad celular en el momento de la siembra, si procede,

— tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,

— sustancias de control positivo y controles negativos,

— métodos de preparación de los portaobjetos y técnica de tinción utilizados,

— criterios para la identificación de micronúcleos,

— números de células analizadas,

— métodos de determinación de la citotoxicidad,

— cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad,

— criterios empleados para considerar si los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos,

— métodos utilizados de análisis estadístico,

— métodos, como la utilización de anticuerpos anti-cinetocoro, para caracterizar si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentos, en su caso.

Resultados:

— parámetro utilizado para medir la citotoxicidad como, por ejemplo, IPBC o IR en caso de aplicación de bloqueo de la citocinesis, o ARRC, DRP o IP cuando no se aplica este bloqueo; otras observaciones pertinentes como, por ejemplo, confluencia celular, apoptosis, necrosis, recuento de metafases, frecuencia de células binucleadas,

— signos de precipitación,

— datos sobre el pH y la osmolalidad del medio de tratamiento, si se han determinado,

— definición de células aceptables para el análisis,

— distribución de las células mono, bi y multinucleadas si se utiliza un método de bloqueo de la citocinesis,

— número de células con micronúcleos, indicado por separado para cada cultivo tratado y de control, precisándose si corresponden a células binucleadas o mononucleadas, en su caso,

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible,

— datos del control negativo (disolvente o vehículo) y de la sustancia de control positivo (concentraciones y disolventes) en paralelo,

— datos históricos del control negativo (disolvente o vehículo) y de las sustancias utilizadas como control positivo, con los rangos, las medias y la desviación típica e intervalo de confianza (por ejemplo, 95 %),

— análisis estadístico; valores p, si se dispone de ellos.

Discusión de los resultados

Conclusiones

▼**M3**

BIBLIOGRAFÍA

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

▼M3

(17) OCDE (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells-results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

▼**M3**

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) CEVMA (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the*in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006. Disponible en la dirección: [http:// ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) PNUMA (2001), Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Disponible en la dirección: [http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group», *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro:* Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

(66) Reglamento (CE) nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE, DO L 229 de 30.4.2004, p. 5.

▼M3

Apéndice 1

Definiciones

Anéugeno: Sustancia o proceso que, por interacción con los componentes del ciclo de división celular mitótica y meiótica, produce aneuploidía en células u organismos.

Aneuploidía: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas en relación con uno o varios cromosomas, pero no con dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

Apoptosis: Muerte celular programada, caracterizada por una serie de fases que llevan a la desintegración de las células para formar partículas limitadas por membranas que se eliminan a continuación por fagocitosis o por liberación.

Proliferación celular: Aumento del número de células como resultado de divisiones celulares mitóticas.

Centrómero: Región del ADN de un cromosoma en la que se mantienen juntas las dos cromátidas y a la que se unen lateralmente los dos cinetocoros.

Clastógeno: Sustancia o proceso que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos.

Citocinesis: Proceso de división celular que sigue inmediatamente a la mitosis para formar dos células hijas, cada una de las cuales contiene un solo núcleo.

Índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC, o CBPI, por su nombre en inglés): Proporción de células de segunda división en la población tratada con respecto al control sin tratar (véase la fórmula en el apéndice 2).

Citostasis: Inhibición del crecimiento celular (véase la fórmula en el apéndice 2).

Citotoxicidad: Efecto nocivo para la función o la estructura celular, que provoca finalmente la muerte de la célula.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de daño al ADN o al cromosoma, incluidas roturas, reorganizaciones de aductos, mutaciones, aberraciones cromosómicas, y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en daño cromosómico estable.

Células en interfase: Células que no se encuentran en fase mitótica.

Cinetocoro: Estructura proteínica que se encuentra en el centrómero de un cromosoma y a la cual se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

Micronúcleos: Núcleos pequeños, adicionales a los núcleos principales de las células y separados de ellos, y producidos durante la telofase de la mitosis o de la meiosis por fragmentos cromosómicos o por cromosomas enteros retardados.

Mitosis: División del núcleo de la célula, generalmente formada por profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

Índice mitótico: Relación entre el número de células en metafase y el número total de células observadas en una población celular; indica el grado de proliferación celular de dicha población.

Mutágeno: Agente que provoca un cambio, en una o varias de las secuencias de pares de bases del ADN o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas), que es hereditario.

▼**M3**

No disyunción: Caso en que las cromátidas emparejadas no se separan ni se segregan adecuadamente para repartirse entre las células hijas en formación, lo que provoca que las células hijas presenten un número anormal de cromosomas.

Poliploidía: Aberraciones cromosómicas numéricas en células u organismos que afectan a dotaciones completas de cromosomas, en contraste con las aberraciones que afectan solo a cromosomas individuales (aneuploidía).

Índice de proliferación (IP): Método de medición de la citotoxicidad cuando no se utiliza la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

Aumento relativo del recuento de células (ARRC, o RICC por su nombre en inglés): Método de medición de la citotoxicidad cuando no se utiliza la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

Duplicación relativa de la población (DRP, o RPD por su nombre en inglés): Método de medición de la citotoxicidad cuando no se utiliza la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

Índice de replicación (IR): Proporción de ciclos de división celular completados en un cultivo tratado con respecto al control sin tratar, durante el período de exposición y de recuperación (véase la fórmula en el apéndice 2).

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

▼M3

Apéndice 2

Fórmulas para la evaluación de la citotoxicidad

1. *Cuando se utiliza citoB,* la evaluación de la citotoxicidad debe basarse en el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) o en el índice de replicación (IR) (16) (58). El IPBC indica el número medio de ciclos celulares por célula durante el período de exposición a la citoB, y puede utilizarse para calcular la proliferación celular. El IR indica el número de núcleos presentes en los cultivos tratados respecto al de los cultivos de control y puede utilizarse para calcular el porcentaje de citostasis:

$$\% \text{ citostasis} = 100 - 100\{(\text{IPBC}_T - 1) \div (\text{IPBC}_C - 1)\}$$

donde:

T = cultivo de tratamiento de la sustancia problema

C = cultivo de control del vehículo

y:

$$\text{IPBC} = \frac{((\text{n}^\text{o} \text{ células mononucleadas}) + (2 \times \text{n}^\text{o} \text{ células binucleadas}) + (3 \times \text{n}^\text{o} \text{ células multinucleadas}))}{(\text{número total de células})}$$

Así pues, un IPBC de 1 (todas las células son mononucleadas) es equivalente al 100 % de citostasis.

$$\text{Citostasis} = 100 - \text{IR}$$

$$\text{IR} = \frac{((\text{n}^\text{o} \text{ células binucleadas}) + (2 \times \text{n}^\text{o} \text{ células multinucleadas})) \div (\text{n}^\text{o} \text{ células totales})_T}{((\text{n}^\text{o} \text{ células binucleadas}) + (2 \times \text{n}^\text{o} \text{ células multinucleadas})) \div (\text{n}^\text{o} \text{ células totales})_C} \times 100$$

donde:

T = cultivos tratados

C = cultivos de control

2. Así pues, un IR del 53 % significa que, respecto al número de células que se han dividido para formar células binucleadas y multinucleadas en el cultivo de control, solo el 53 % de este número se ha dividido en el cultivo tratado, es decir, hay un 47 % de citostasis.

3. *Cuando no se utiliza citoB,* se recomienda evaluar la citotoxicidad sobre la base del aumento relativo del recuento celular (ARRC) o de la duplicación relativa de la población (DRP) (58), ya que ambos parámetros tienen en cuenta la proporción de la población celular que se ha dividido.

$$\text{ARRC} = \frac{(\text{Aumento del número de células en los cultivos tratados } (\text{n}^\text{o} \text{ final} - \text{n}^\text{o} \text{ inicial}))}{(\text{Aumento del número de células en los cultivos de control } (\text{n}^\text{o} \text{ final} - \text{n}^\text{o} \text{ inicial}))} \times 100$$

$$\text{DRP} = \frac{(\text{no de duplicaciones de la población en los cultivos tratados})}{(\text{no de duplicaciones de la población en los cultivos de control})} \times 100$$

▼**M3**

donde:

Duplicación de la población = [log (nº células tras el tratamiento ÷ nº células iniciales)] ÷ log 2

4. Así pues, un ARRC o una DRP del 53 % indica un 47 % de citotoxicidad o citostasis.

5. Si se utiliza el índice de proliferación (IP), es posible evaluar la citotoxicidad mediante el recuento de los clones formados por una célula (cl1), dos células (cl2), de tres a cuatro células (cl4) y de cinco a ocho células (cl8):

$$IP = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. El IP se ha utilizado como un parámetro válido y fiable de citotoxicidad también para líneas celulares cultivadas *in situ* en ausencia de citoB (25) (26) (27) (28).

▼M3

Apéndice 3

Sustancias de referencia recomendadas para evaluar el comportamiento ([1])

Categoría	Sustancia	Nº CAS	Nº CE
1. Clastógenos activos sin activación metabólica			
	Arabinósido de citosina	147-94-4	205-705-9
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
2. Clastógenos que necesitan activación metabólica			
	Benzo(a)pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
3. Anéugenos			
	Colchicina	64-86-8	200-598-5
	Vimblastina	143-67-9	205-606-0
4. Sustancias negativas			
	Ftalato de di-(2-etilhexilo)	117-81-7	204-211-0
	Ácido nalidíxico	389-08-2	206-864-7
	Pireno	129-00-0	204-927-3
	Cloruro sódico	7647-14-5	231-598-3

([1]) Las sustancias de referencia son aquellas cuyo uso se recomienda. Pueden incluirse otras sustancias en lugar de las de la lista de sustancias de referencia, o además de ellas, si se conoce su actividad y si inducen la formación de micronúcleos por los mismos mecanismos de acción, y si se demuestra que son pertinentes para las sustancias que se van a ensayar con el procedimiento de MNvit. En función del objetivo, la justificación podría incluir asimismo un estudio de validación en que se haya utilizado una amplia variedad de sustancias o que se haya centrado en un espectro más reducido basado en la clase química de la sustancia problema o en el mecanismo del daño que se estudie.

▼M3

B.50. **SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: DA**

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Se ha revisado el primer método de ensayo (ME) para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA, así como una revisión de los trabajos asociados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En el LLNA, para medir la proliferación de linfocitos se utilizan timidina o yodo radioisotópicos, por lo que el ensayo tiene una utilidad limitada, dados los problemas que implica la adquisición, utilización y eliminación de sustancias radiactivas. El LLNA: DA (desarrollado por Daicel Chemical Industries, Ltd.) es una modificación no radiactiva del LLNA, en la que se cuantifica mediante bioluminiscencia el contenido de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador de la proliferación de los linfocitos. El método de ensayo LLNA: DA ha sido validado y examinado, y recomendado por un grupo internacional de examen por pares, que lo ha considerado útil para identificar tanto sustancias que son sensibilizantes cutáneos como sustancias que no lo son, con ciertas limitaciones (10) (11) (12) (13). Este ME está diseñado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. En el capítulo B.6 del presente anexo y en la TG 406 de la OCDE se utilizan ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (14). Tanto el LLNA (capítulo B.42 del presente anexo, TG 429 de la OCDE) como sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA (capítulo B.50 del presente anexo, TG 442 A de la OCDE) y el LLNA: BrdU-ELISA (capítulo B.51 del presente anexo, TG 422 B de la OCDE), suponen una ventaja respecto a los ensayos con cobayas del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (14) en cuanto a la reducción y refinamiento del uso de animales.

2. El LLNA: DA, de forma similar al LLNA, estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Además, su capacidad de detectar sensibilizantes cutáneos sin necesidad de utilizar el marcado radiactivo del ADN suprime la posibilidad de que haya exposición ocupacional a la radiactividad y problemas de eliminación de residuos. Esto, a su vez, permitiría un mayor uso de los ratones para detectar sensibilizantes cutáneos, lo que podría reducir aún más la utilización de cobayas en ensayos que determinen el potencial de sensibilización cutánea (es decir, el capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (14).

DEFINICIONES

3. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA: DA es un método LLNA modificado para identificar posibles sensibilizantes cutáneos, con limitaciones específicas. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA: DA en lugar del LLNA o de los ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6, TG 406 de la OCDE) (14) sino que, como su valor es equivalente, el LLNA: DA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior (10) (11). Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre la sustancia problema. Tal información ha de

▼M3

incluir la identidad y la estructura química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA: DA es apropiado para la sustancia problema [dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA: DA (véase el punto 5)] y para ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA: DA es un método *in vivo*, por lo que no elimina el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. Sin embargo, ofrece la posibilidad de reducir el uso de animales con este objetivo, respecto al nivel exigido por los ensayos con cobayas (capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (14). Además, el LLNA: DA supone un refinamiento sustancial (menos dolor y molestias) de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto, ya que, al contrario que los ensayos del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE, no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. A pesar de las ventajas que supone el LLNA: DA con respecto al capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (14), tiene ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar estos métodos (capítulo B.6 y TG 406 de la OCDE), como, por ejemplo, los ensayos de ciertos metales, los resultados falsos positivos que se producen con determinados irritantes cutáneos (como algunas sustancias de tipo tensioactivo) (6) (1 y capítulo B.42 del presente anexo) o la solubilidad de la sustancia problema. Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (16) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6 o la TG 406 de la OCDE) (14). Se ha recomendado que las limitaciones señaladas para el LLNA (1 y capítulo B.42 del presente anexo) se apliquen también al LLNA: DA (10). Además, puede que no sea apropiado recurrir al LLNA: DA para ensayar sustancias que afectan a los niveles de ATP (por ejemplo, sustancias que actúan como inhibidores del ATP) o en aquellos casos en que se vea afectada la medición exacta del contenido de ATP intracelular (por ejemplo, presencia de enzimas que degradan el ATP, presencia de ATP extracelular en el ganglio linfático). Dejando aparte estas limitaciones identificadas, el LLNA: DA debe ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que esta tenga propiedades asociadas que puedan interferir con la exactitud del LLNA: DA. Por otra parte, debe contemplarse la posibilidad de resultados positivos dudosos cuando se obtienen valores del índice de estimulación (IE) entre 1,8 y 2,5 (véanse los puntos 31 y 32). Esto se justifica por la base de datos de validación de 44 sustancias utilizando un IE ≥ 1,8 (véase el punto 6) de las que el LLNA: DA identificó correctamente la totalidad de los 32 sensibilizantes del LLNA, pero identificó incorrectamente tres de los doce productos no sensibilizantes con valores del IE entre 1,8 y 2,5 (es decir, positivos dudosos) (10). Sin embargo, como se ha utilizado el mismo conjunto de datos para establecer los valores del IE y para calcular las propiedades de predicción del ensayo, los resultados indicados pueden suponer una sobreestimación de las propiedades de predicción reales.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El principio básico del LLNA: DA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia problema. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 1,8 para que se pueda

▼M3

justificar el seguir con la evaluación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos descritos aquí se basan en el uso del contenido de ATP, medido por bioluminiscencia y del que se sabe que se corresponde con el número de células vivas (17), para indicar un aumento del número de células en proliferación en los ganglios linfáticos auriculares (18) (19). El método de bioluminiscencia utiliza la enzima luciferasa para catalizar la formación de luz a partir de ATP y luciferina de acuerdo con la siguiente reacción:

$$ATP + Luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + Luz$$

La intensidad de la luz emitida está relacionada linealmente con la concentración de ATP y se mide con un luminómetro. El ensayo con luciferina-luciferasa es un método sensible para cuantificar el ATP, utilizado en una amplia variedad de aplicaciones (20).

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Los estudios de validación del LLNA: DA se han efectuado exclusivamente con la cepa CBA/J, por lo que se considera que esta es la cepa preferida (12) (13). Se utilizan hembras jóvenes adultas, nulíparas y no preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que en la respuesta del LLNA: DA no existen diferencias significativas relacionadas con la cepa o el sexo.

Alojamiento y alimentación

8. Los ratones deben alojarse en grupos (21), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Preparación de los animales

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

Preparación de las soluciones administradas

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

▼M3

Verificación de la fiabilidad

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA: DA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar una respuesta positiva en el LLNA: DA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del IE $\geq$ 1,8 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del control positivo debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un IE > 10 se consideraría excesivo). Los CP preferidos son aldehído hexilcinámico (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) y eugenol (nº CAS 97-53-0), ambos al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos $\leq$ 6 meses) del control positivo en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA: DA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de CP históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA: DA mediante la obtención constante de resultados positivos con los CP en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA: DA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados sobre los controles positivos.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin control positivo en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con control positivo. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con control positivo periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con las sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con control positivo periódico aceptable y el estudio con control positivo periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un control positivo en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de control positivo en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (22).

▼M3

15. Aunque el producto utilizado como CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (23). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser útil también emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA: DA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de animales y niveles de dosis

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y del vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (2) y (24). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (24) (25). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (6), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

▼M3

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de la sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 33). Además, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP solamente cuando se toman datos de los distintos animales (22). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. La recogida periódica de datos de cada animal aporta una ventaja en cuanto al bienestar de los animales al evitar la duplicación de ensayos, que podrían ser necesarios si los resultados sobre la sustancia problema recogidos inicialmente de una manera (por ejemplo, por datos de conjuntos de animales) tuvieran que ser considerados posteriormente por las autoridades normativas con otros requisitos (por ejemplo, de datos de cada animal).

Ensayo de cribado previo

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA: DA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA: DA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA: DA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 8). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (25). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), el día 7 (24 horas antes del final) y el día 8. Además, el día 8 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación local viene indicada por una puntuación de eritema ≥ 3 o por un aumento del espesor de la oreja $\geq$ 25 % cualquiera de los días de medición (26) (27). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA: DA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18), induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

Cuadro 1

Puntuación del eritema

Observación	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2

▼M3

Observación	Puntuación
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema	4

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (26) (27), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 % que sean estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (35) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA: DA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 8, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos de dolor o de sufrimiento intenso deben sacrificarse de forma compasiva (36).

Calendario experimental del estudio principal

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. Se aplica al dorso de cada oreja una solución acuosa de laurilsulfato de sodio (LSS) al 1 %, utilizando un pincel impregnado con la solución de LSS de modo que con cuatro o cinco pinceladas se cubra todo el dorso de cada oreja. Una hora tras la aplicación del LSS, se aplican en el dorso de cada oreja 25 µL de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2, 3 y 7:* Se repite el procedimiento de aplicación efectuado el día 1, con aplicación previa de la solución acuosa de LSS al 1 %, seguida de la aplicación de la sustancia problema.

— *Días 4, 5 y 6:* Sin tratamiento.

— *Día 8:* Se toma nota del peso de cada animal, así como de las eventuales observaciones clínicas. Unas 24 o 30 horas tras el inicio de la aplicación del día 7, se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se ponen en solución amortiguadora de fosfato (PBS), separando los de cada animal. En la referencia (22) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

▼M3

Preparación de las suspensiones celulares

26. De cada ratón se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos extirpados bilateralmente colocando los ganglios linfáticos entre dos portaobjetos de vidrio y aplicando una presión ligera, para aplastarlos. Tras confirmar que el tejido se ha extendido finamente, se separan los dos portaobjetos. Se suspende en LSS el tejido presente en ambos portaobjetos, poniéndolos en ángulo sobre una placa Petri y lavando con PBS, separando a la vez el tejido del portaobjetos con un raspador celular. Por otra parte, como los ganglios linfáticos de los animales del CN son pequeños, es importante extremar el cuidado para evitar la aparición de efectos artificiales en los valores del IE. Para el lavado de ambos portaobjetos debe utilizarse un volumen total de 1 mL de PBS. La suspensión de células de los ganglios linfáticos en la placa Petri debe homogeneizarse ligeramente con el raspador celular. Se toma a continuación con una micropipeta una alícuota de 20 μL de esta suspensión, procurando no incluir la membrana, visible a simple vista, y se mezcla después con 1,98 mL de PBS para obtener una muestra de 2 mL. Después se prepara otra muestra de 2 mL siguiendo el mismo procedimiento, de forma que de cada animal se obtienen dos muestras.

Determinación de la proliferación celular (medición del contenido de ATP de los linfocitos)

27. Los aumentos del contenido de ATP en los ganglios linfáticos se miden con el método de la luciferina/luciferasa, utilizando un juego de medición de ATP, que mide la bioluminiscencia en unidades relativas de luminiscencia (URL). El tiempo transcurrido entre el momento del sacrificio de los animales y la medición del contenido de ATP de cada animal deber ser uniforme, y no sobrepasar aproximadamente los 30 minutos, porque se considera que el contenido de ATP va disminuyendo gradualmente según transcurre el tiempo a partir del sacrificio de los animales (12). Así pues, la serie de operaciones desde la extracción de los ganglios linfáticos auriculares hasta la medición del ATP debe efectuarse en el plazo de 20 minutos, siguiendo una pauta temporal preestablecida, que será la misma con todos los animales. Se debe medir la luminiscencia del ATP en cada muestra de 2 mL, de forma que de cada animal se efectúan dos mediciones del ATP. A continuación se determina la luminiscencia media del ATP, que es el valor utilizado para los cálculos posteriores (véase el punto 30).

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

28. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (36).

Pesos corporales

29. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

30. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE medio. El IE se obtiene dividiendo la media de los valores de URL de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores de URL de los ratones del grupo de control del vehículo (CV) o disolvente. El IE medio del CV es entonces la unidad.

▼M3

31. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 1,8 (10). Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos de disolvente o vehículo y CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso (es decir, con un valor del IE entre 1,8 y 2,5) se declara positivo (2) (3) (37).

32. En caso de una respuesta positiva dudosa, con un IE entre 1,8 y 2,5, es posible que los usuarios deseen considerar información adicional, tal como la relación dosis-respuesta, las pruebas de toxicidad sistémica o de irritación excesiva, y, en su caso, la significación estadística, junto con los valores del IE para confirmar si tales resultados son positivos (10). Deben tenerse también en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (4).

33. La recogida de datos de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos para la presencia y grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos paralelos de control de disolvente o vehículo). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados «valores atípicos»).

DATOS E INFORME

Datos

34. Los datos deben resumirse en forma de cuadro, con indicación de los valores de URL de cada animal, la media de los valores de URL de los animales del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo paralelo de control del disolvente o vehículo.

Informe del ensayo

35. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote],

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

▼**M3**

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— origen del juego de medición del ATP, su número de lote y los datos del control o garantía de calidad de su fabricante,

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN (disolvente o vehículo) en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— momento del sacrificio del animal y momento de la medición del ATP de cada animal,

— un cuadro con los valores de URL y del IE de cada ratón, dentro de cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores de URL/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento,

▼**M3**

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos de la sustancia problema como en los de control,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no un sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (*2010*), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OCDE (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly ►C1 luciferasa ◄ in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(25) OCDE (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (38).

Sustancia de evaluación comparativa: Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características fisicoquímicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

Falso negativo: ►**C1** Sustancia problema identificada incorrectamente ◄ como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa.

►**C1** *Falso positivo:* Sustancia problema identificada incorrectamente ◄ como positiva o activa por un ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva.

Peligro: Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias problema, pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (38).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (38).

Valor atípico: Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

Garantía de calidad: Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro por parte de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (38).

Sensibilización cutánea: Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

Índice de estimulación (IE): Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

▼M3

B.51. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: BrdU-ELISA

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Se ha revisado el primer método de ensayo (ME) para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA y una revisión de los trabajos relacionados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En el LLNA, para medir la proliferación de linfocitos se utilizan timidina o yodo radioisotópicos, por lo que el ensayo tiene una utilidad limitada, dados los problemas que implica la adquisición, utilización y eliminación de sustancias radiactivas. El LLNA: BrdU-ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) es una modificación no radiactiva del LLNA que utiliza 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) sin marcado radiactivo (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) en un sistema de ensayo basado en el ELISA, para medir la proliferación de los linfocitos. El método de ensayo LLNA: BrdU-ELISA ha sido validado y examinado, y recomendado por un grupo internacional de científicos independientes de examen por pares, que lo ha considerado útil para identificar tanto sustancias que son sensibilizantes cutáneos como sustancias que no lo son, con ciertas limitaciones (10) (11) (12). Este ME está diseñado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. En el capítulo B.6 del presente anexo y en la TG 406 de la OCDE se utilizan ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (13). Tanto el LLNA (capítulo B.42 del presente anexo, TG 429 de la OCDE) como sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: BrdU-ELISA (capítulo B.51 del presente anexo, TG 422B de la OCDE) y el LLNA: DA (capítulo B.50 del presente anexo, TG 442A de la OCDE), suponen una ventaja respecto a los ensayos con cobayas del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (13) en cuanto a la reducción y refinamiento del uso de animales.

2. El LLNA: BrdU-ELISA, de forma similar al LLNA, estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Además, su capacidad de detectar sensibilizantes cutáneos sin la necesidad de utilizar el marcado radiactivo del ADN suprime la posibilidad de que haya exposición ocupacional a la radiactividad y problemas de eliminación de residuos. Esto, a su vez, permitiría un mayor uso de los ratones para detectar sensibilizantes cutáneos, lo que podría reducir aún más la utilización de cobayas en ensayos que determinen el potencial de sensibilización cutánea (es decir, el capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (13).

DEFINICIONES

3. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA: BrdU-ELISA es un método LLNA modificado para identificar posibles sensibilizantes cutáneos, con limitaciones específicas. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA: BrdU-ELISA en lugar del LLNA o de los ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6, TG 406 de la OCDE) (13) sino que, como su valor es equivalente, el LLNA: BrdU-ELISA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior (10) (11). Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre la sustancia

▼M3

problema. Tal información ha de incluir la identidad y la estructura química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA: BrdU-ELISA es apropiado para la sustancia problema [dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA: BrdU-ELISA (véase el punto 5)] y para ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA: BrdU-ELISA es un método *in vivo*, por lo que no eliminará el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. Sin embargo, ofrece la posibilidad de reducir el uso de animales con este objetivo, respecto al nivel exigido por los ensayos con cobayas (capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (13). Además, el LLNA: BrdU-ELISA supone un refinamiento sustancial de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto, ya que, al contrario que los ensayos del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE, no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Tampoco exige el uso de coadyuvantes, como ocurre en el ensayo de maximización con cobayas (capítulo B.6 del presente anexo, 13). Por consiguiente, el LLNA: BrdU-ELISA reduce las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone el LLNA: BrdU-ELISA con respecto al capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (13), tiene ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar estos métodos (capítulo B.6 y TG 406 de la OCDE), como, por ejemplo, los ensayos de ciertos metales, los resultados falsos positivos que se producen con determinados irritantes cutáneos (como algunas sustancias de tipo tensioactivo) (6) (1 y capítulo B.42 del presente anexo) o la solubilidad de la sustancia problema. Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (15) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6 o la TG 406 de la OCDE) (13). Se ha recomendado que las limitaciones señaladas para el LLNA (1 y capítulo B.42 del presente anexo) se apliquen también al LLNA: BrdU-ELISA (10). Dejando aparte estas limitaciones detectadas, el LLNA: BrdU-ELISA debería ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que haya propiedades asociadas a esta que puedan interferir con la exactitud del LLNA: BrdU-ELISA. Por otra parte, debe contemplarse la posibilidad de resultados positivos dudosos cuando se obtienen valores del índice de estimulación (IE) entre 1,6 y 1,9 (véanse los puntos 31 y 32). Esto se justifica por la base de datos de validación de 43 sustancias utilizando un IE ≥ 1,6 (véase el punto 6) de las que el LLNA: BrdU-ELISA identificó correctamente la totalidad de los 32 sensibilizantes del LLNA, pero identificó incorrectamente dos de los once productos no sensibilizantes con valores de IE entre 1,6 y 1,9 (es decir, positivos dudosos) (10). Sin embargo, como se ha utilizado el mismo conjunto de datos para establecer los valores del IE y para calcular las propiedades de predicción del ensayo, los resultados indicados pueden suponer una sobreestimación de las propiedades de predicción reales.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El principio básico del LLNA: BrdU-ELISA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia química. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 1,6 para que se pueda justificar el seguir con la evaluación de la sustancia problema como posible

▼M3

sensibilizante cutáneo. Los procedimientos aquí descritos se basan en medir el contenido de BrdU y utilizarlo para indicar el aumento del número de células en proliferación presentes en los ganglios linfáticos auriculares que drenan la zona. El BrdU es un análogo de la timidina y se incorpora de forma similar en el ADN de las células en proliferación. La incorporación del BrdU se mide mediante ELISA, que utiliza un anticuerpo específico del BrdU, marcado también con peroxidasa. Cuando se añade el sustrato, la peroxidasa reacciona con este y se obtiene un producto coloreado, que se cuantifica a una absorbancia específica con un lector de placas de microtitulación.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Selección de la especie animal

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Los estudios de validación del LLNA: BrdU-ELISA se han efectuado exclusivamente con la cepa CBA/J, por lo que se considera que esta es la cepa preferida (10) (12). Se utilizan hembras jóvenes adultas, nulíparas y no preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que en la respuesta del LLNA: BrdU-ELISA no existen diferencias significativas relacionadas con la cepa o el sexo.

Alojamiento y alimentación

8. Los ratones deben alojarse en grupos (16), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Preparación de los animales

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

Preparación de las soluciones administradas

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

Verificación de la fiabilidad

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las

▼M3

autoridades competentes antes de efectuar el LLNA: BrdU-ELISA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar respuesta positiva en el LLNA: BrdU-ELISA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del IE ≥ 1,6 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del CP debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un IE > 14 se consideraría excesivo). Los CP preferidos son aldehído hexilcinámico (nº CAS 101-86-0) y eugenol (nº CAS 97-53-0), ambos al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos ≤ 6 meses) del CP en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA: BrdU-ELISA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de CP históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA: BrdU-ELISA mediante la obtención constante de resultados positivos con los CP en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA: BrdU-ELISA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados de los CP.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin control positivo en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con control positivo. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con control positivo periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con control positivo periódico aceptable y el estudio con control positivo periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un CP en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de CP en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (17).

15. Aunque el producto utilizado como CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (18). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

▼M3

16. En los casos en que se evalúen sustancias problema de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser útil también emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias problema. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA: BrdU-ELISA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de animales y niveles de dosis

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y el vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (2) y (19). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (19) (20 y capítulo B.4 del presente anexo). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (6), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias problema hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

▼M3

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 33). Además, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP solamente cuando se toman datos de los distintos animales (17). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. La recogida periódica de datos de cada animal aporta una ventaja en cuanto al bienestar animal al evitar la duplicación de ensayos, que podrían ser necesarios si los resultados sobre la sustancia problema recogidos inicialmente de una manera (por ejemplo, por datos de conjuntos de animales) tuvieran que ser considerados posteriormente por las autoridades normativas con otros requisitos (por ejemplo, de datos de cada animal).

Ensayo de cribado previo

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA: BrdU-ELISA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser una concentración del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 6). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (20, y capítulo B.4 del presente anexo). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), y el día 6. Además, el día 6 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación local viene indicada por una puntuación de eritema ≥ 3 o por un espesor de la oreja ≥ 25 % cualquiera de los días de medición (21) (22). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18) induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

Cuadro 1

Puntuación de eritema

Observación	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2

▼M3

Observación	Puntuación
Eritema de moderado a intenso	3
Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema	4

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (21) (22), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 %, estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (30) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA: BrdU-ELISA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 6, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos de dolor o de sufrimiento intenso deben sacrificarse de forma compasiva (31).

Calendario experimental del estudio principal

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. En el dorso de cada oreja se aplican 25 μL de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2 y 3:* Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.

— *Día 4:* Sin tratamiento.

— *Día 5:* Se inyectan por vía intraperitoneal 0,5 mL (5 mg/ratón) de una solución de BrdU (10 mg/mL).

— *Día 6:* Se toma nota del peso de cada animal, así como de las eventuales observaciones clínicas. A las 24 horas, aproximadamente, de la inyección de BrdU, se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se sumergen en solución amortiguadora de fosfato (PBS), separando los de cada animal. En la referencia (17) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

▼M3

Preparación de las suspensiones celulares

26. De cada ratón se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos (CGL) extirpados bilateralmente, mediante disgregación mecánica suave a través de una malla de acero inoxidable de 200 μm de luz, u otra técnica aceptable que permita obtener una suspensión de células sueltas (por ejemplo, uso de un mortero de plástico desechable para aplastar los ganglios linfáticos, seguido del paso por una malla de nailon de 70 μm). El procedimiento de preparación de la suspensión de CGL es de importancia crítica en este ensayo y por tanto cada operario debe adquirir de forma anticipada habilidad para efectuarlo. Por otra parte, como los ganglios linfáticos de los animales del CN son pequeños, es importante extremar el cuidado para evitar la aparición de efectos artificiales en los valores del IE. En cada caso, el volumen final de la suspensión de CGL debe ajustarse a un volumen optimizado determinado (de unos 15 mL). El volumen optimizado se basa en lograr una absorbancia media del grupo de CN entre 0,1 y 0,2.

Determinación de la proliferación celular (medición del contenido de BrdU en el ADN de los linfocitos)

27. El contenido de BrdU se mide mediante ELISA utilizando un juego comercial (por ejemplo, el de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11 647 229 001). En resumen, a los pocillos de una microplaca de fondo plano se añaden por triplicado 100 μL de la suspensión de CGL. Tras la fijación y desnaturalización de las CGL, se añade a cada pocillo anticuerpo anti-BrdU y se deja reaccionar. Después se elimina por lavado el anticuerpo anti-BrdU y, a continuación, se añade la solución de sustrato y se deja que se produzca el cromógeno. Entonces, se mide la absorbancia a 370 nm con una longitud de onda de referencia de 492 nm. En todos los casos, deben optimizarse las condiciones del ensayo (véase el punto 26).

OBSERVACIONES

Observaciones clínicas

28. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (31).

Pesos corporales

29. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

30. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE medio. El IE se obtiene dividiendo la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema, y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los ratones del grupo de control del disolvente o vehículo (CV). El IE medio del CV es entonces la unidad.

El índice de marcado con BrdU se define de la manera siguiente:

$$\text{Índice de marcado con BrdU} = (\text{ABS}_{le} - \text{ABS blanco}_{le}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS blanco}_{ref})$$

donde: le = longitud de onda de emisión; y ref = longitud de onda de referencia.

▼M3

31. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 1,6 (10). Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos del disolvente o vehículo y del CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso (es decir, con un valor del IE entre 1,6 y 1,9) se declara positivo (3) (6) (32).

32. En caso de una respuesta positiva dudosa, con un IE entre 1,6 y 1,9, es posible que los usuarios deseen considerar información adicional, tal como la relación dosis-respuesta, las pruebas de toxicidad sistémica o de irritación excesiva, y, en su caso, la significación estadística, junto con los valores del IE para confirmar si tales resultados son positivos (10). Deben tenerse también en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (4).

33. La recogida de datos de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos para la presencia y grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos paralelos de control de disolvente o vehículo). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados «valores atípicos»).

DATOS E INFORME

Datos

34. Los datos deben resumirse en forma de cuadro, con indicación de los valores del índice de marcado con BrdU de cada animal, la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los animales del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo paralelo de control de disolvente o vehículo.

Informe del ensayo

35. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote),

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

▼M3

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— origen del juego de ELISA, su número de lote y los datos del control o garantía de calidad de su fabricante (sensibilidad y especificidad del anticuerpo y límite de detección),

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN (disolvente o vehículo) en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— un cuadro con los valores del índice de marcado con BrdU y del IE de cada ratón, dentro de cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores del índice de marcado con BrdU/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento,

▼M3

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos de la sustancia problema como en los de control,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OCDE (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OCDE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Apéndice 1

DEFINICIONES

Exactitud: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (33).

Sustancia de evaluación comparativa: Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características físicas y químicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

Falso negativo: Sustancia problema identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa (33).

Falso positivo: Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva o activa por un ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva (33).

Peligro: Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El *efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.*

Reproducibilidad interlaboratorios: Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo la misma sustancia problema pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (33).

Reproducibilidad intralaboratorios: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (33).

Valor atípico: Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

Garantía de calidad: Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro por parte de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

Fiabilidad: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (33).

Sensibilización cutánea: Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

Índice de estimulación (IE): Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

Sustancia problema (o producto químico problema): Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

▼M4

B.52. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 436 de la OCDE (2009). Las primeras TG 403 de toxicidad aguda por inhalación se adoptaron en 1981 y desde entonces han sido revisadas [véase el capítulo B.2 de este anexo (1)]. Se consideró apropiado desarrollar un método de clases de toxicidad aguda por inhalación [Acute Toxic Class o ATC, (2) (3) (4)] después de adoptar el método de las clases de toxicidad aguda por vía oral (capítulo B.1 *ter* de este anexo) (5). Una evaluación retrospectiva de los resultados del método de las clases de toxicidad aguda por inhalación reveló que es adecuado para los fines de clasificación y etiquetado (6). El método de las clases de toxicidad aguda por inhalación permite aplicar una progresión serial de concentraciones previamente definidas para obtener una escala de toxicidad de la sustancia problema. El criterio de valoración principal es la letalidad, pero los animales moribundos o que presenten signos de dolor, angustia o sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva para minimizar su sufrimiento. Se recomienda consultar el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (7).

2. Se ofrece una guía para la realización e interpretación de estudios según este método de ensayo en el documento de orientación nº 39 sobre los ensayos de toxicidad por inhalación aguda (GD 39) (8).

3. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan en el apéndice 1 y en el documento GD 39 (8).

4. El método de ensayo proporciona información acerca de los factores de riesgo y facilita la ordenación y clasificación de la sustancia problema de conformidad con el Reglamento (CE) nº 1272/2008 en relación con la clasificación de las sustancias químicas que provocan toxicidad aguda (9). Cuando sea preciso calcular valores puntuales de CL50 o analizar la relación concentración-respuesta, el método de ensayo recomendable es el que se describe en el capítulo B.2 del presente anexo (1). Se ofrecen más orientaciones sobre la selección del método de ensayo en el documento de orientación (GD) nº 39 (8). El presente método de ensayo no ha sido concebido específicamente para el análisis de productos especializados, como materiales fibrosos o isométricos escasamente solubles o nanoproductos manufacturados.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. Antes de considerar la aplicación de este método de ensayo y con el fin de minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de análisis deberá tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia problema, sin olvidar los estudios existentes cuyos datos pudieran desaconsejar la realización de nuevas investigaciones. En la selección de la especie, cepa, sexo y modo de exposición más apropiados resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro*; uso(s) previsto(s) y posible exposición humana; datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de sustancias estructuralmente afines. No deberán investigarse con este método de ensayo concentraciones que previsiblemente provoquen un dolor o sufrimiento intensos debido a efectos corrosivos ([1]) o irritantes graves [véase el documento GD 39 (8)].

([1]) La evaluación de la corrosividad puede basarse en la opinión de expertos con información sobre: experiencia en animales y humanos, datos (*in vitro*) disponibles [capítulos B.40 (10) y B.40 *bis* (11) de este anexo y TG 435 de la OCDE (12)], valores de pH, información acerca de sustancias afines o cualesquiera otros datos pertinentes.

▼M4

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. El ensayo se basa en un procedimiento secuencial, en el que se obtiene suficiente información sobre la toxicidad aguda por inhalación de la sustancia problema durante un período de exposición de 4 horas, para permitir su clasificación. Pueden aplicarse otros tiempos de exposición con fines normativos específicos. Cada una de las fases de concentración definidas se investiga en 3 animales de cada sexo. Dependiendo del número de animales que se encuentren muertos o moribundos, pueden bastar 2 fases de concentración para evaluar la toxicidad aguda de la sustancia problema. Si hay indicios de que uno de los sexos es más sensible que el otro, la investigación debe proseguir únicamente con el sexo más sensible. El resultado de la fase preliminar determina cuál será la fase siguiente, de manera que:

a) no se requieran más ensayos,

b) se investiguen tres animales de cada sexo, o

c) se investiguen solo 6 animales del sexo más sensible; es decir, el cálculo del límite inferior de la clase tóxica debe basarse en 6 animales por grupo de concentración experimental, independientemente del sexo.

7. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (7) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

8. Hay que usar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie recomendada es la rata y, en caso de usar otra especie, se justificará debidamente.

Preparación de los animales

9. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la exposición, los animales serán adultos jóvenes de 8 a 12 meses de edad y su peso corporal no se desviará en más del ± 20 % del peso medio de su sexo calculado en animales previamente expuestos de la misma edad. Los animales se seleccionan al azar y se marcan para permitir su identificación individual. Se mantiene a los animales en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio. Deberán también aclimatarse al equipo del ensayo durante un breve período preliminar, para así reducir el estrés provocado por la introducción en un entorno nuevo.

Zootecnia

10. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas,

▼M4

térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Cámaras de inhalación

11. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo por la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzar mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento GD 39 (8) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

12. Se recomienda un período de exposición prefijado de cuatro horas, sin contar el tiempo de equilibrado. El período puede variar dependiendo de las necesidades concretas, pero se justificarán los motivos en el informe del estudio [véase el documento GD 39 (8)]. Los animales expuestos en cámaras de cuerpo entero se enjaularán de manera individual para evitar la ingestión de la sustancia problema debido a las conductas de limpieza de los compañeros de jaula. Se suprimirá la alimentación durante el período de exposición. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

13. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. Las condiciones físicas de la investigación dependerán de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará dicha sustancia durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas.

Distribución granulométrica

14. Se controlará el tamaño de partícula en todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 4 μm, con una desviación típica geométrica (σg) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (8) (13) (14). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Por ejemplo, los humos metálicos pueden tener un diámetro de partícula menor, mientras que las partículas con carga, las fibras y las sustancias higroscópicas (que aumentan de tamaño en el medio húmedo de las vías respiratorias) pueden sobrepasar este límite de referencia.

▼M4

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

15. Se puede recurrir a un vehículo para crear una concentración y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia problema en la atmosfera. Por regla general se dará preferencia al agua. El material particulado se puede someter a tratamientos mecánicos para obtener la distribución granulométrica deseada, pero procurando no descomponer ni alterar la sustancia problema. Cuando se considere que los procesos mecánicos pueden haber alterado la composición de la sustancia problema (por ejemplo, las temperaturas extremas de una fricción excesiva), esta se verificará analíticamente. Se pondrá especial atención para no contaminar la sustancia problema. No es necesario analizar compuestos granulados no friables que han sido intencionadamente formulados como no inhalables. Se recurrirá a una prueba de desgaste para demostrar que no se generan partículas respirables durante la manipulación del material granulado. Si en la prueba de desgaste se generan partículas respirables, habrá que efectuar un ensayo de toxicidad por inhalación.

Animales de control

16. No es necesario emplear un grupo de control negativo (con aire) en paralelo. Si se usa un vehículo distinto del agua para generar la atmósfera experimental, solo será necesario recurrir a un grupo de control del vehículo cuando no se disponga de datos anteriores de toxicidad por inhalación. Si un ensayo de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada; por lo tanto, no se precisa un control del vehículo.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

17. El caudal de aire de la cámara se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión de la concentración (o estabilidad) atmosférica del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de interés en la generación de un escenario atmosférico. Se pondrá especial atención para evitar la reinspiración en las cámaras de solo por la nariz en aquellos casos en los que el caudal de aire a través del sistema de exposición sea insuficiente para crear un flujo continuo del medio atmosférico de ensayo. Se han descrito metodologías capaces de demostrar que no tiene lugar la reinspiración en las condiciones operativas establecidas (8) (15). La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no están consiguiendo estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

18. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. La humedad relativa en la zona de respiración de los animales, cuando se trata de exposiciones de solo por la nariz y de cuerpo entero, se supervisará y registrará al menos tres veces en operaciones de hasta 4 horas, y cada hora en operaciones más cortas. La humedad relativa debe mantenerse idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia con el método de ensayo).

▼M4

Sustancia problema: concentración nominal

19. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

Sustancia problema: concentración real

20. La concentración real es la concentración de sustancia problema presente en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia de ensayo. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trate de productos en forma de aerosol capaces de evaporar o sublimar, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases. En el informe del estudio se harán constar las concentraciones diana, nominales y reales, pero en los análisis estadísticos destinados a calcular los valores de concentración letal se emplean solo las concentraciones reales.

21. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema, que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

22. La atmósfera de exposición se mantendrá constante en la medida de lo posible y bajo supervisión continua y/o intermitente, dependiendo del método analítico. Si la técnica de muestreo es intermitente, habrá que tomar muestras atmosféricas de la cámara por lo menos dos veces en un ensayo de cuatro horas. De no ser esto posible por darse concentraciones bajas o un caudal de aire limitado, se podrá tomar una muestra en todo el período de exposición. Si se producen fluctuaciones importantes de una muestra a otra, para analizar las siguientes concentraciones se tomarán cuatro muestras por exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, y en ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y registrará el tiempo de equilibrado de la cámara (t_{95}). La duración de cualquier exposición abarca el tiempo que tarda en generarse la sustancia problema, lo que incluye el tiempo necesario para alcanzar t_{95}. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} en el documento de orientación nº 39 (8).

▼M4

23. Cuando se manejan mezclas muy complejas de gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación, de modo que se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o del componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (8).

Sustancia problema: distribución granulométrica

24. La distribución granulométrica en los aerosoles se determinará al menos dos veces por cada período de exposición de 4 horas, empleando un impactador de cascada o un aparato alternativo como un medidor del tamaño aeorodinámico de partícula. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (8)]. Si es posible demostrar su equivalencia en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir la exposición. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases (véase el punto 14).

PROCEDIMIENTO

Ensayo principal

25. En cada fase se estudian tres animales de cada sexo, o bien seis animales del sexo más sensible. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. La concentración que se usará en la fase inicial se selecciona de entre una a cuatro concentraciones predefinidas, y debe ser aquella que provoque más probablemente toxicidad en algunos de los animales tratados. Los esquemas de ensayo de gases, vapores y aerosoles (apéndices 2 a 4) se articulan en torno a los valores de corte de las categorías 1-4 del Reglamento CLP (9) para gases (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 horas; apéndice 2), para vapores (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 horas; apéndice 3) y para aerosoles (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 horas; apéndice 4). La categoría 5, que no se contempla en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9), corresponde a concentraciones por encima de las respectivas concentraciones límite. A cada concentración inicial se le aplica el correspondiente esquema de ensayo. En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas hasta establecer una categoría.

26. El intervalo de tiempo entre los grupos de exposición se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. La exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente estudiados. Se recomienda un período de tres o cuatro días entre la administración de cada nivel de dosis para poder observar la toxicidad retardada. Este intervalo puede ajustarse según convenga, por ejemplo en caso de respuestas no concluyentes.

▼M4

Ensayo límite

27. El ensayo límite se practica cuando se sabe o supone que la sustancia problema es prácticamente atóxica, es decir, que induce una respuesta tóxica solo cuando supera la concentración límite normativa. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre sustancias o mezclas afines, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se disponga de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en las que se prevea que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal [se ofrecen más indicaciones en el documento de orientación (GD) nº 39 (8)].

28. Según el procedimiento habitual se exponen tres animales de cada sexo, o seis animales del sexo más sensible, a concentraciones de 20 000 ppm de gases, 20 mg/l de vapores o 5 mg/l de polvos/nieblas, respectivamente y siempre que se puedan alcanzar, lo que constituye el ensayo límite de este método. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (es decir, un MMAD de 1-4 μm). El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase el documento GD 39 (8)]. De conformidad con el SGA (16), por razones de bienestar animal se desaconseja investigar más allá de las concentraciones límite. La realización de pruebas en la categoría 5 (16) del SGA, que no está recogida en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9), solo se contemplará cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana, lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes del ensayo límite, para confirmar que se crean en la cámara las condiciones adecuadas para dicho ensayo límite.

CONTEXTO

29. Los animales se someterán a observación clínica frecuente durante el período de exposición. Las observaciones clínicas se repetirán al menos dos veces el día de la exposición, o más frecuentemente si lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y en lo sucesivo al menos una vez al día durante un período total de 14 días. La duración del período de observación no es fija, antes bien deberá determinarse en función de la naturaleza y el tiempo de aparición de los signos clínicos y de la longitud del período de recuperación. Es importante conocer el momento en el que aparecen y desaparecen los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Por razones de bienestar animal, los animales moribundos o que den muestras de dolor o signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva. En el momento de explorar los signos clínicos de toxicidad, se procurará que el mal aspecto inicial y los trastornos respiratorios transitorios, derivados del procedimiento de exposición, no se confundan con efectos relacionados con el tratamiento. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el documento de orientación sobre criterios de tratamiento compasivo [Humane Endpoints Guidance Document (7)]. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

▼M4

30. Las observaciones en de la jaula deberían incluir los cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Cuando sea posible se diferenciarán los efectos locales de los sistémicos. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento.

Peso corporal

31. Los pesos corporales individuales se registrarán una vez durante el período de aclimatación, en el día previo a la exposición (día 0), y al menos en los días 1, 3 y 7 (y, en lo sucesivo, semanalmente) y en el momento de la muerte o la eutanasia si se produce después del día 1. Se acepta que el peso corporal es un indicador crítico de la toxicidad, por lo que deberán vigilarse estrechamente los animales que muestren una reducción progresiva de peso $\geq$ 20 % en comparación con los valores preliminares. Los animales supervivientes se pesan y se sacrifican de forma compasiva al final del período de post-exposición.

Anatomía patológica

32. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de comprobar la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a temperaturas suficientemente bajas para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

33. Se podrán contemplar otras exploraciones incluidas de antemano en el diseño para ampliar el valor interpretativo del estudio, como la medida del peso pulmonar de las ratas que sobrevivan o el examen microscópico de las vías respiratorias para aportar pruebas de irritación. La exploración de órganos puede extenderse a aquellos que muestran signos de anatomapatología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas y a los órganos que se saben o suponen afectados. El examen microscópico de la totalidad de las vías respiratorias puede proporcionar información útil en el caso de sustancias problema que son reactivas con el agua, como las de naturaleza ácida o higroscópica.

DATOS E INFORME

Datos

34. Se documentarán por separado los datos de peso corporal y los resultados de la autopsia de cada animal. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y sin reversibilidad, y los resultados de la autopsia.

▼M4

Informes de los ensayos

35. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Animales de experimentación y zootecnia

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

— Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de asignación al azar.

— Pormenores de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema:

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo:

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación:

— Descripción de la cámara de inhalación, incluidos las dimensiones y el volumen.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Equipo empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente de aire, tratamiento del aire suministrado/extraído y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del equipo para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (de solo por la nariz); ubicación de los animales en el sistema (de cuerpo entero).

— Homogeneidad/estabilidad temporal de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Caudales de aire, caudal del aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Descripción del equipo empleado para medir el oxígeno y el dióxido de carbono, si procede.

▼M4

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición:

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, mg/m^3, etc.); se podrán indicar además las unidades de volumen (ppm, ppmm) entre paréntesis.

— Distribución del tamaño de partícula, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σg), incluidos los correspondientes métodos de cálculo; se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo:

— Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema; cuando exista la posibilidad de que los procesos mecánicos hayan alterado la composición de la sustancia problema, se incluirán los resultados de los análisis realizados para verificar dicha composición.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados:

— Tabulación de los valores de temperatura de la cámara, humedad y caudal de aire.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de tamaño de partícula, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y σ_g.

— Tabulación de las respuestas y niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad y duración de los efectos),

— Pesos corporales de cada animal registrados en el estudio; fecha y hora de la muerte si se produce antes de la eutanasia programada; cronología de la aparición de los signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal.

▼M4

— Resultados de la autopsia y observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

— Categoría de la clasificación CLP y valor de corte de la CL_{50}.

Evaluación e interpretación de los resultados:

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para cumplir los criterios del presente método de ensayo, esto es, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

— Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (7).

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Capítulo B.2 del presente anexo. Toxicidad aguda por inhalación.

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 1: 129-134.

(5) Capítulo B.1 *ter* del presente anexo. Toxicidad oral aguda. Método de las clases de toxicidad aguda.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Capítulo B.40 del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo de resistencia eléctrica transcutánea (RET).

(11) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo con modelo de piel humana.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) Naciones Unidas (2007), Sistema globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), ST/SG/AC.10/30, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en la dirección: [http://www.unece.org.es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_s.html]

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼**M4**

Apéndice 2

Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de gases (ppm/4 horas)

Observaciones generales ([1])

Por cada concentración inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

Apéndice 2a: concentración inicial de 100 ppm

Apéndice 2b: concentración inicial de 500 ppm

Apéndice 2c: concentración inicial de 2 500 ppm

Apéndice 2d: concentración inicial de 20 000 ppm

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

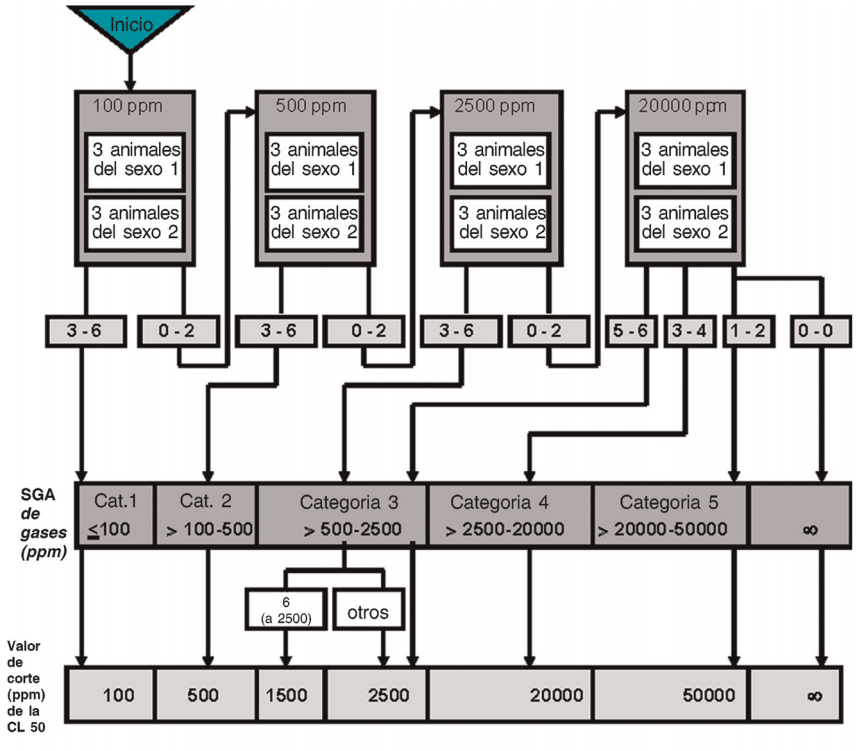
([1]) En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) nº 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

▼M4

Apéndice 2a

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 100 ppm/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

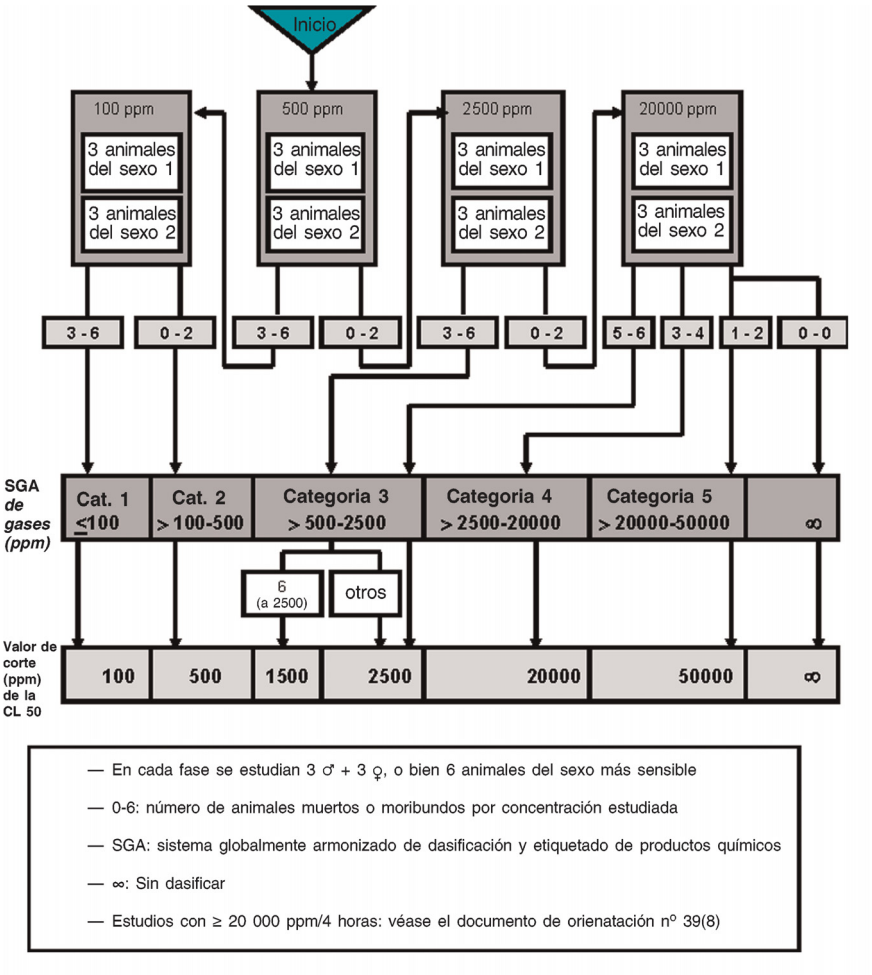
— Estudios con = 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 2b

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 500 ppm/4 horas

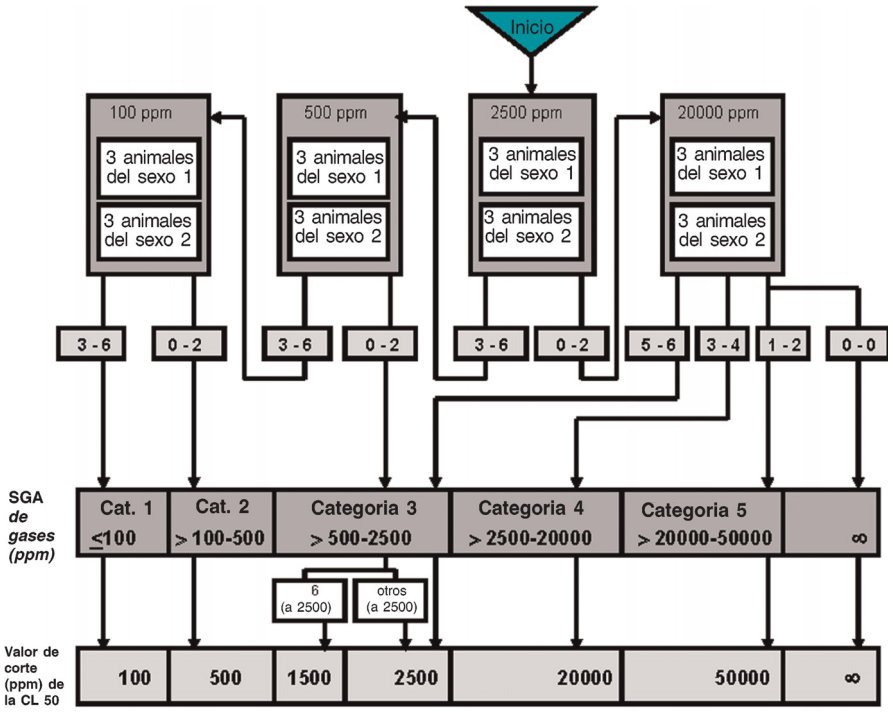


▼M4

Apéndice 2c

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 2 500 ppm/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0–6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

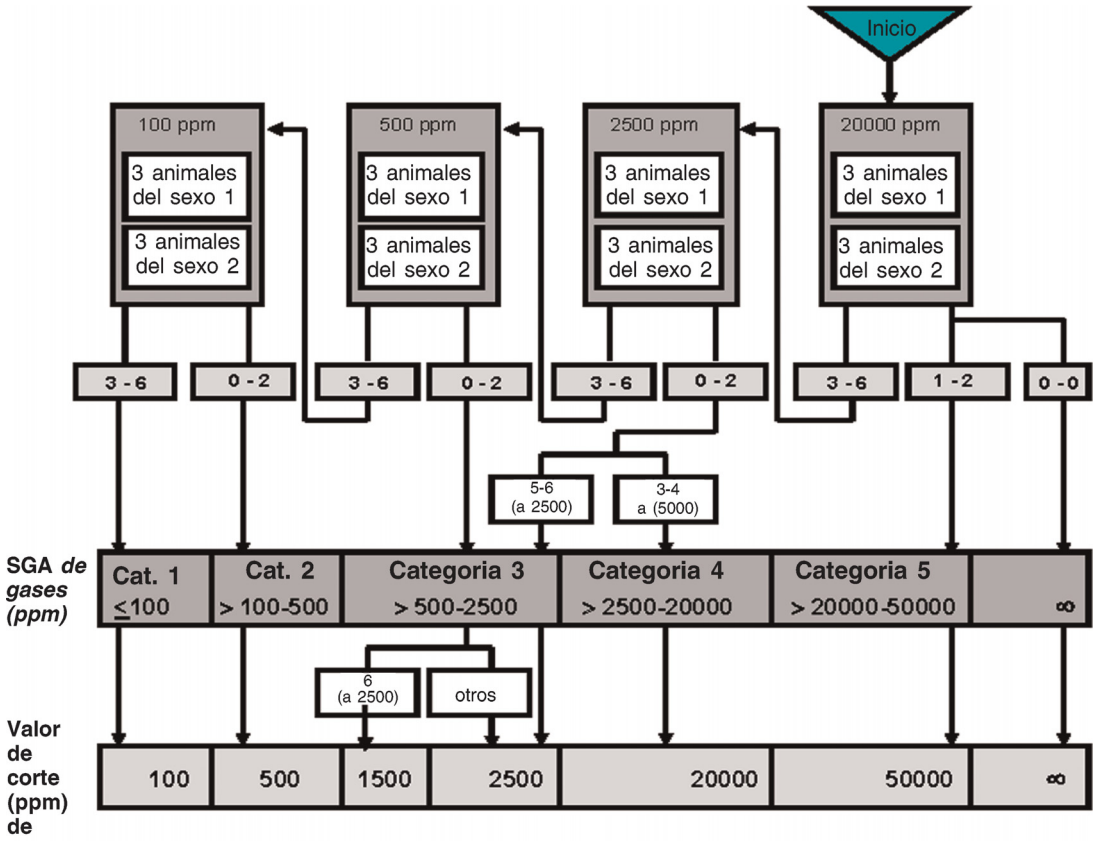
— Estudios con = 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 2d

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 20 000 ppm/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

— Estudios con ≥ 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 3

Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de vapores (mg/l/4 horas)

Observaciones generales ([1])

Por cada concentración inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

Apéndice 3a: concentración inicial de 0,5 mg/l

Apéndice 3b: concentración inicial de 2,0 mg/l

Apéndice 3c: concentración inicial de 10 mg/l

Apéndice 3d: concentración inicial de 20 mg/l

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

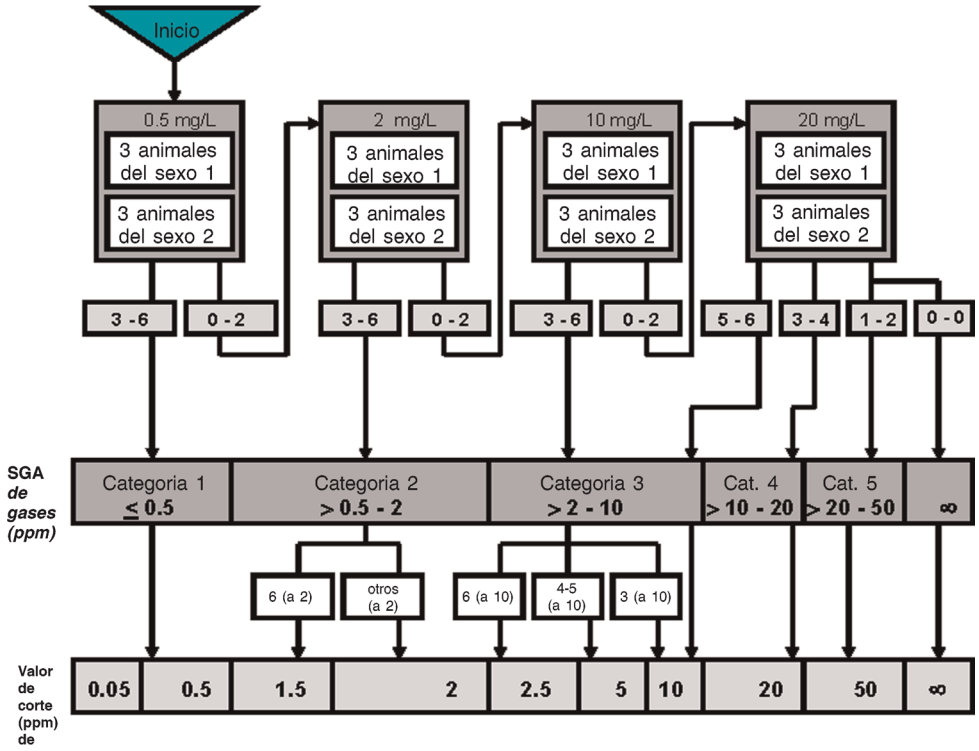
([1]) En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) nº 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

▼M4

Apéndice 3a

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 0,5 mg/l/4 horas



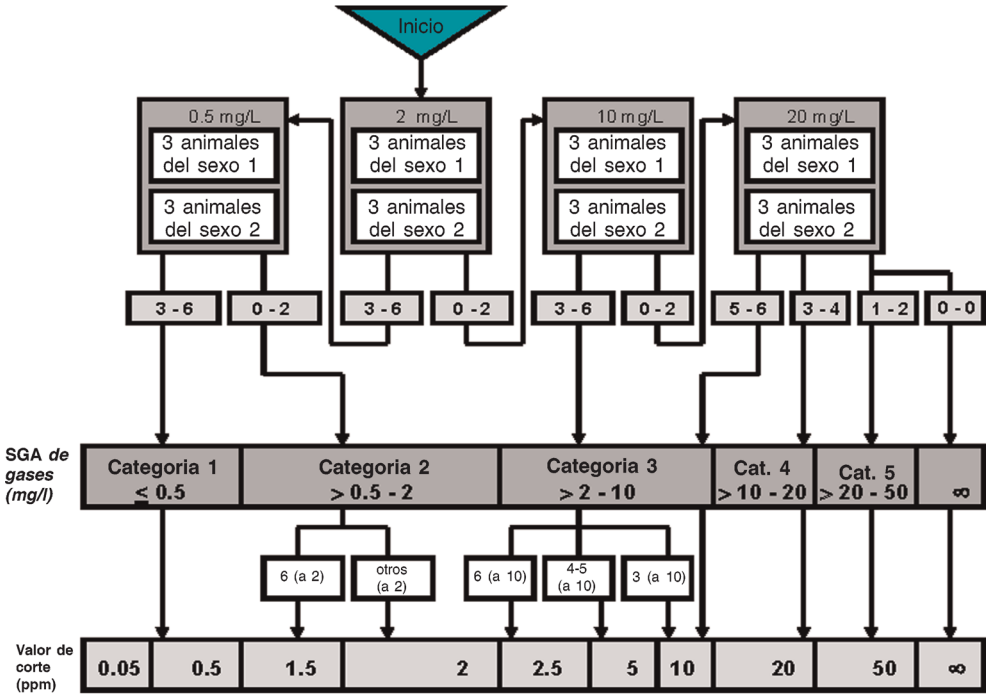
- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin dasificar
- Estudios con 50 mg/l4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 3b

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 2 mg/l/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0–6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

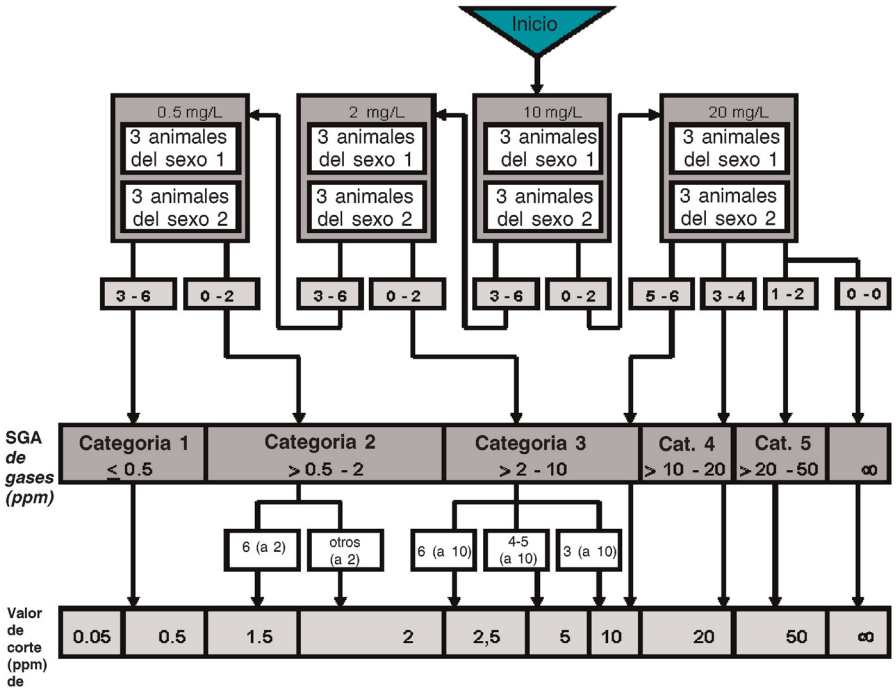
— Estudios con 50 mg/l4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 3c

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 10 mg/l/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0–6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

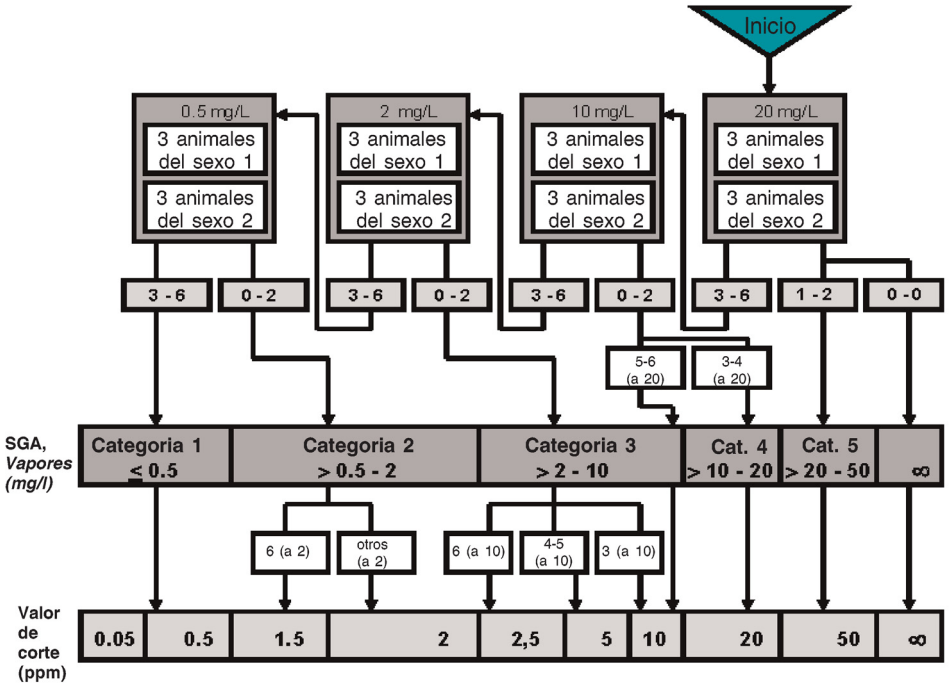
— Estudios con 50 mg/l4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 3d

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 20 mg/l/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: sin dasificar

— Estudios con 50 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 4

Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de aerosoles (mg/l/4 horas)

Observaciones generales ([1])

Por cada concentración inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

Apéndice 4a: concentración inicial de 0,05 mg/l

Apéndice 4b: concentración inicial de 0,5 mg/l

Apéndice 4c: concentración inicial de 1 mg/l

Apéndice 4d: concentración inicial de 5 mg/l

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

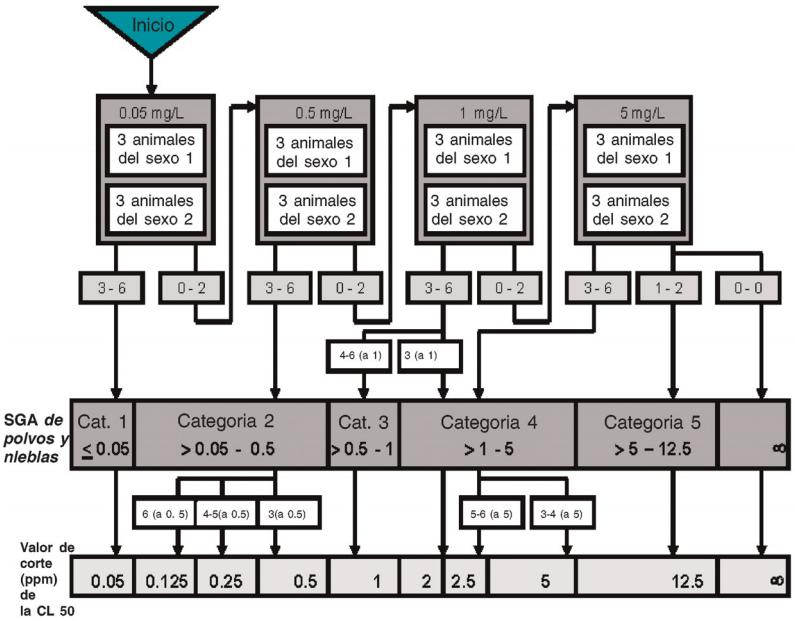
([1]) En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) nº 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

▼M4

Apéndice 4a

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 0,05 mg/l/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin clasificar

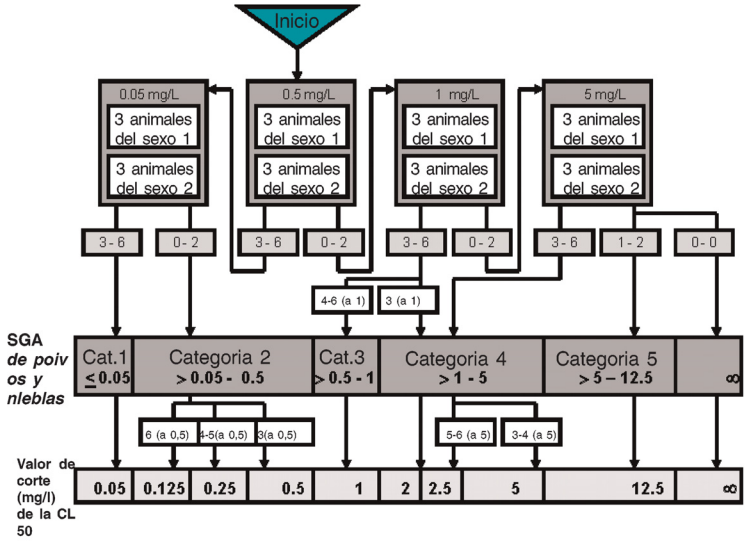
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 4b

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 0,5 mg/l/4 horas



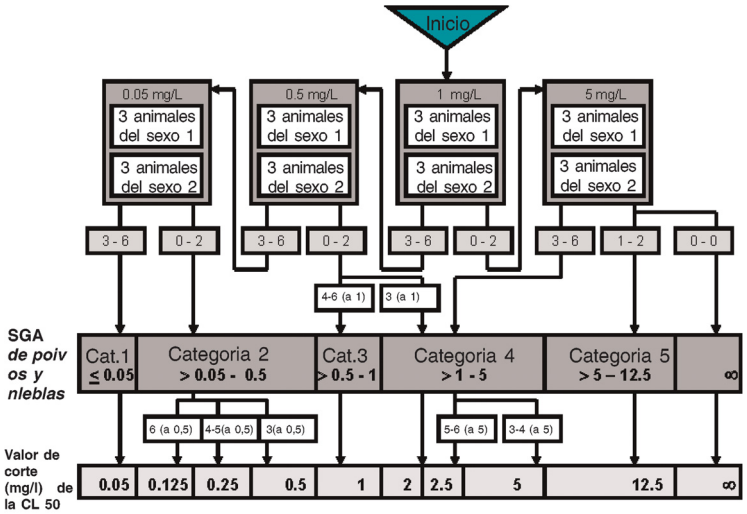
— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
— ∞: Sin dasificar
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 4c

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 1 mg/l/4 horas



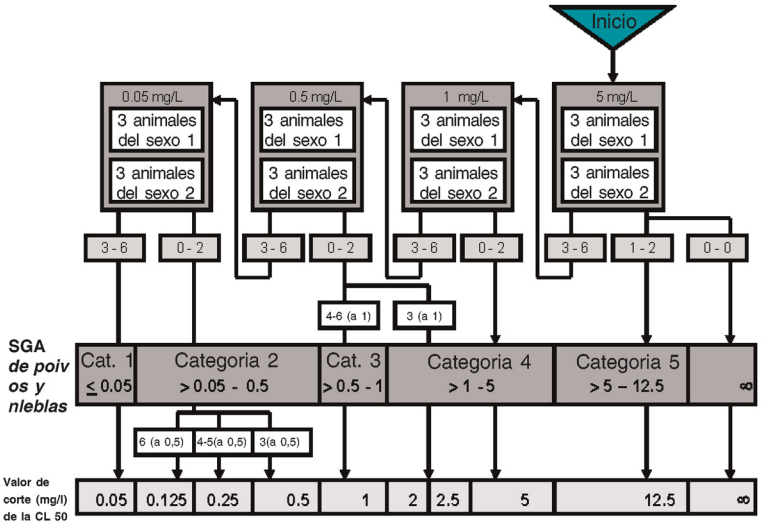
— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
— ∞: Sin dasificar
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

Apéndice 4d

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 5 mg/l/4 horas



— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
— ∞: Sin dasificar
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)»

▼B

PARTE C: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD

ÍNDICE

C.1. TOXICIDAD AGUDA EN PECES

C.2. ENSAYO DE INMOVILIZACIÓN AGUDA DE *DAPHNIA* SP

C.3. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGAS Y CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE

C.4. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD «FÁCIL»

PARTE I. CONSIDERACIONES GENERALES

PARTE II. ENSAYO BASADO EN LA PÉRDIDA DE COD (Método C.4-A)

PARTE III. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OCDE MODIFICADO (Método C.4-B)

PARTE IV. ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE CO_2 (Método C.4-C)

PARTE V. RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA (Método C.4-D)

PARTE VI. ENSAYO DEL FRASCO CERRADO (Método C.4-E)

PARTE VII. ENSAYO DEL M.I.T.I. (Método C.4-F)

C.5 DEGRADACIÓN: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

C.6. DEGRADACIÓN: DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

C.7. DEGRADACIÓN — DEGRADACIÓN ABIÓTICA: HIDRÓLISIS EN FUNCIÓN DEL PH

C.8. TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA

C.9. BIODEGRADACIÓN — PRUEBA ZAHN-WELLENS

C.10. PRUEBA DE SIMULACIÓN DE TRATAMIENTO AERÓBICO DE AGUAS RESIDUALES: C.10-A: UNIDADES DE LODO ACTIVADO — C.10-B: BIOPELÍCULAS

C.11. BIODEGRADACIÓN — LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN

C.12. BIODEGRADACIÓN — PRUEBA LASC MODIFICADA

C.13 BIOCONCENTRACIÓN: ENSAYO DINÁMICO CON PECES

C.14. ENSAYO DE CRECIMIENTO EN PECES JUVENILES

C.15. ENSAYO DE TOXICIDAD A CORTO PLAZO EN *EMBRIONES* DE PEZ Y ALEVINES

C.16. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL AGUDA EN ABEJAS

C.17. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR CONTACTO EN ABEJAS

C.18. ADSORCIÓN/DESORCIÓN SEGÚN UN MÉTODO EQUILIBRADO POR LOTES

▼**B**

C.19.	CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE ADSORCIÓN *(K_{OC})* EN SUELOS Y EN LODOS DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)
C.20	ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL NITRÓGENO
C.22.	MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBONO
C.23.	TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN EL SUELO
C.24.	TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN SISTEMAS DE SEDIMENTOS ACUÁTICOS
C.25.	MINERALIZACIÓN AEROBIA EN AGUAS SUPERFICIALES. ENSAYO DE SIMULACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN
C.26.	PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *LEMNA* SPP.

▼**M4**

C.27.	ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO
C.28.	ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTOS-AGUA CON AGUA ENRIQUECIDA
C.29.	BIODEGRADABILIDAD FÁCIL—CO_2 EN RECIPIENTES SELLADOS (ENSAYO DEL ESPACIO DE CABEZA)
C.30.	BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS TERRESTRES

▼B

C.1. TOXICIDAD AGUDA EN PECES

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este ensayo es determinar la toxicidad letal aguda de una sustancia en peces de agua dulce. Es conveniente disponer, en la medida de lo posible, de una amplia información sobre la hidrosolubilidad, la presión de vapor, la estabilidad química, las constantes de disociación y la biodegradabilidad de la sustancia de ensayo, con el fin de seleccionar el método de ensayo más apropiado (estático, semiestático, dinámico), que permita garantizar concentraciones constantes de la sustancia de ensayo durante todo el período de ensayo.

Tanto en la planificación del ensayo como en la interpretación de los resultados deberá tenerse en cuenta otro tipo de información suplementaria (por ejemplo, la fórmula estructural, el grado de pureza, la naturaleza y porcentaje de impurezas significativas, la presencia y cantidad de aditivos, así como el coeficiente de reparto n-octanol/agua)

1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

La toxicidad aguda es el efecto adverso, discernible, inducido en un organismo como consecuencia de la exposición a una sustancia dada durante un corto período de tiempo (días). En el presente ensayo, la toxicidad aguda viene expresada como la concentración letal media (CL_{50}), es decir, la concentración que, en el agua, causa la muerte del 50 % de los peces de un lote sometido a ensayo durante un período de exposición continuo que debe indicarse.

Todas las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (mg/l). Pueden expresarse también en peso por peso (mg/kg^{-1}).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Se podrá efectuar un ensayo con una sustancia de referencia a fin de demostrar que, en las condiciones experimentales de laboratorio, la respuesta de la especie sometida al ensayo no ha variado significativamente.

Para este ensayo no se especifica ninguna sustancia de referencia.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Puede realizarse una prueba límite a 100 mg/l, para demostrar que la CL_{50} es mayor que esta concentración.

Se exponen los peces a la sustancia o sustancias de ensayo añadidas al agua, durante un período de 96 horas y en un intervalo de concentraciones determinado. Se registra la mortalidad, como mínimo, cada 24 horas y se calculan, si es posible, las concentraciones causantes de la muerte del 50 % de los peces (CL_{50}) en cada período de observación.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad se aplicarán tanto al ensayo límite como al método de ensayo definitivo.

La mortalidad de los testigos, no debe sobrepasar el 10 % al final del ensayo (o un pez si se utilizan menos de 10).

La concentración de oxígeno disuelto debe ser superior al 60 % del valor de saturación, a la largo de todo el ensayo.

▼B

La concentración de la sustancia de ensayo debe ser superior al 80 % de la concentración inicial durante todo el ensayo.

Para las sustancias que se disuelven fácilmente en el medio de ensayo, produciendo soluciones estables, es decir, que no se volatilizan, degradan, hidrolizan ni adsorben en cantidad significativa, la concentración inicial puede considerarse equivalente a la concentración nominal. Se demostrará que se han mantenido las concentraciones a lo largo del ensayo y de que se han satisfecho los criterios de calidad.

En cuanto a las sustancias

i) poco solubles en el medio de ensayo, o

ii) capaces de formar emulsiones o dispersiones estables, o

iii) no estables en soluciones acuosas,

se tomará como concentración inicial la concentración medida en la solución (o, si no es técnicamente posible, medida en la columna de agua) al comienzo del ensayo. La concentración se determinará tras un período de equilibrio pero antes de introducir los peces de ensayo.

En cualquiera de estos casos se harán mediciones complementarias, durante el ensayo, con el fin de confirmar la concentración de exposición real o que se han mantenido los criterios de calidad.

El pH no variará más de 1 unidad.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Pueden utilizarse tres tipos de procedimientos.

Ensayo estático

Ensayo de toxicidad durante el cual no hay renovación de la solución de ensayo {las soluciones no se renuevan durante todo el ensayo).

Ensayo semiestático

Ensayo sin renovación continua de la solución de ensayo, pero con renovación periódica, de las soluciones de ensayo después de períodos prolongados (por ejemplo, cada 24 horas).

Ensayo dinámico

Ensayo de toxicidad durante el cual se va renovando constantemente el agua de los recipientes de ensayo. El producto químico sometido a ensayo se transporta con el agua utilizada para renovar el medio de ensayo.

1.6.1. **Reactivos**

1.6.1.1. *Soluciones de las sustancias de ensayo*

Las soluciones madre a las concentraciones requeridas se preparan disolviendo la sustancia en agua desionizada o en agua según el punto 1.6.1.2.

Las concentraciones elegidas para el ensayo se preparan mediante dilución de la solución madre. Si se procede a un ensayo a concentraciones elevadas, la sustancia puede disolverse directamente en el agua de dilución.

▼B

En general, las sustancias se ensayaran solo hasta su límite de solubilidad. En el caso de algunas sustancias (por ejemplo, aquellas que son poco hidrosolubles, que tienen un elevado P_{ow} o que forman en el agua dispersiones estables más que verdaderas soluciones), se puede aceptar una concentración de ensayo por encima del límite de solubilidad de la sustancia a fin de garantizar que se obtiene la máxima concentración soluble/estable. Es importante, sin embargo, que esta concentración no altere por otra parte el sistema de ensayo (por ejemplo, formación en la superficie del agua de una película de la sustancia que impida la oxigenación del agua, etc.)

Puede utilizarse dispersión ultrasónica, solventes orgánicos, emulgentes o dispersantes para favorecer la preparación de las soluciones madre de las sustancias poco hidrosolubles o para que dichas sustancias se dispersen mejor en el medio de ensayo. Cuando se utilicen estas sustancias auxiliares, todas las concentraciones de ensayo deberán contener la misma cantidad de sustancia auxiliar y se expondrá un lote de peces como testigo suplementario a la misma concentración de la sustancia auxiliar que la utilizada en las series del ensayo. La concentración de esas sustancias auxiliares debe reducirse al mínimo, y en ningún caso será superior a 100 mg por litro en el medio de ensayo.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si se produjera un cambio significativo del pH, debe repetirse el ensayo ajustando el pH y registrar los resultados. En ese caso, el valor del pH de la solución madre debe ajustarse al valor del pH del agua de dilución, excepto que existan razones concretas que lo impidan. Para ajustar el pH se utilizará, preferentemente, HC1 o NaOH. Este ajuste del pH debe efectuarse de forma que no se modifique significativamente la concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre. Si el ajuste ocasiona una reacción química o una precipitación física de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. *Agua de mantenimiento y de dilución*

Se podrá utilizar agua potable (no contaminada por concentraciones potencialmente peligrosas de cloro, metales pesados u otras sustancias), agua natural de buena calidad o agua reconstituida (véase el Apéndice 1). Se preferirán las aguas cuya dureza total esté comprendida entre 10 y 250 mg por litro (como $CaCO_3$), y un pH comprendido entre 6,0 y 8,5.

1.6.2. **Equipo**

El equipo debe ser de material químicamente inerte:

— sistema de dilución automático (para el ensayo dinámico),

— aparato para medir el oxígeno,

— aparato para determinar la dureza del agua,

— equipo apropiado para el control de la temperatura,

— pHmetro.

1.6.3. **Peces del ensayo**

Los peces deben gozar de buena salud y estar exentos de malformaciones visibles.

▼B

Se recomienda que la especie utilizada se elija en función de criterios prácticos como disponibilidad inmediata durante todo el año, fácil mantenimiento, comodidad para el ensayo, sensibilidad relativa a las sustancias químicas, y todos los demás factores significativos económicos, biológicos o ecológicos. Debe tenerse también en cuenta, al seleccionar la especie de peces, la necesidad de que los datos sean comparables y la existencia de una armonización internacional en vigor (referencia 1).

Las especies que se recomiendan para la realización de este ensayo figuran en el apéndice 2; las especies preferidas son el pez cebra y la trucha.

1.6.3.1. *Mantenimiento*

Los peces que se someten al ensayo deberán provenir preferentemente de un solo lote, siendo todos los individuos de longitud y edad similares. Deben mantenerse, al menos durante 12 días, en las siguientes condiciones.

Carga:

apropiada al sistema (recirculación o ensayo dinámico) y a la especie de peces.

Agua:

véase el punto 1.6.1.2.

Luz:

fotoperíodo de 12 a 16 horas por día.

Concentración de oxigeno disuelto:

al menos 80 % del valor de saturación.

Alimentación:

diariamente o 3 veces por semana; la alimentación debe ser interrumpida 24 horas antes de comenzar el ensayo.

1.6.3.2. *Mortalidad*

Se registrará la mortalidad después de un período inicial de 48 horas. Se juzgará la calidad del lote según los siguientes criterios:

— mortalidad superior al 10 % de la población en 7 días:

se rechaza todo el lote,

— mortalidad al cabo de 7 días comprendida entre el 5 y el 10 % de la población:

se prolongará el período de observación 7 días más.

Si no aparecen nuevas mortalidades, se admite el lote, en caso contrario debe rechazarse,

— mortalidad inferior al 5 % de la población:

se admite el lote.

1.6.4. **Adaptación**

Los peces deben mantenerse en las condiciones de ensayo (calidad y temperatura del agua), durante al menos 7 días antes de su utilización.

▼B

1.6.5. **Procedimiento del ensayo**

Antes del ensayo definitivo se puede proceder a un ensayo para determinar el intervalo de concentraciones eficaces, el cual proporcionará información sobre el intervalo de concentraciones que deberán utilizarse en el ensayo definitivo.

Se efectuará un control (o testigo), sin sustancia de ensayo y, si se considera importante, un control (o testigo) con la sustancia auxiliar, además de las concentraciones de ensayo propiamente dichas.

Se elegirá un método estático, semiestático o dinámico, en función de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de ensayo, para cumplir los criterios de calidad.

Los peces estarán expuestos a la sustancia de ensayo en las siguientes condiciones:

— duración: 96 horas,

— número de animales: al menos 7 por concentración,

— recipientes: de una capacidad apropiada, en función de la carga recomendada,

— carga: se recomienda una carga máxima de 1,0 g por litro para los ensayos estáticos y semiestáticos; para los ensayos dinámicos se puede aceptar una carga más elevada,

— concentraciones de ensayo: al menos cinco concentraciones de ensayo que difieran en un factor constante no mayor de 2,2 y abarcando si es posible el intervalo de 0 a 100 % de mortalidad,

— agua: véase el punto 1.6.1.2,

— luz: fotoperíodo de 12 a 16 horas por día,

— temperatura: apropiada para la especie elegida (apéndice 2), pero en los límites de ± 1 ºC, en cualquier ensayo concreto,

— concentración en oxígeno disuelto: al menos el 60 % del valor de la saturación a la temperatura elegida,

— alimento: ninguno.

Los peces se observaran después de las 2 a 4 primeras horas y, al menos, a intervalos de 24 horas. Los peces son considerados muertos si el toque del pedúnculo caudal no produce reacción alguna y no se percibe ningún movimiento respiratorio. Los peces muertos se retirarán en el momento de cada observación y se registrará la mortalidad. Se registrarán las anomalías visibles (por ejemplo, pérdida de equilibrio, cambios en el comportamiento natatorio, función respiratoria, pigmentación, etc.).

Diariamente se medirá el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura.

Ensayo límite

Puede realizarse un ensayo límite a 100 mg por litro, utilizando los procedimientos descritos en este método de ensayo, con el fin de demostrar que la CL_{50} es mayor que dicha concentración.

Si la naturaleza de la sustancia no permite alcanzar una concentración de 100 mg por litro en el agua de ensayo, el ensayo límite debe ser realizado a una concentración igual a la solubilidad de la sustancia (o a la máxima concentración que forme una dispersión estable) en el medio utilizado (véase también el punto 1.6.1.1).

▼B

El ensayo límite se realizará utilizando de 7 a 10 peces, y el mismo número en los controles (o testigos). (La teoría binomial indica que cuando se utilizan 10 peces y la mortalidad es cero, hay un limite de confianza del 99,9 % de que la CL_{50} es mayor que la concentración usada en el ensayo límite. Si se utilizan 7, 8 o 9 peces, la ausencia de mortalidad proporciona un límite de confianza del 99 % de que la CL_{50} es mayor que la concentración usada.)

Si aparece mortalidad, debe ser realizado un estudio completo. Si se observan efectos subletales, deben registrarse.

2. **RESULTADOS Y EVALUACIÓN**

Se trazará sobre papel log-probit el porcentaje de mortalidad en función de la concentración, para cada período en que se registren observaciones (24, 48, 72 y 96 horas).

Cuando sea posible y para cada tiempo de observación, se calculará la CL_{50} con sus límites de confianza ($p = 0,05$) utilizando procedimientos estandarizados; estos valores se redondearán a una o, como mucho, dos cifras significativas (ejemplos de redondeo a dos cifras: 170 en lugar de 173,5; 0,13 en lugar de 0,127; 1,2 en lugar de 1,21).

Si la pendiente de la curva de concentración/porcentaje de respuesta es demasiado acentuada como para permitir calcular la CL_{50}, bastará con una estimación gráfica de este valor.

Si dos concentraciones consecutivas, con una razón de 2,2, dan solo 0 y 100 % de mortalidad, estos dos valores serán suficientes para indicar el rango en el que se encuentra la CL_{50}.

Si se observa que la estabilidad o la homogeneidad de la sustancia de ensayo no puede mantenerse, se mencionará en el informe y se tendrá en cuenta al interpretar los resultados.

3. **INFORME**

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— información acerca del pez de ensayo (nombre científico, cepa, proveedor, tratamiento previo eventual, tamaño y número utilizado en cada concentración de ensayo),

— origen del agua de dilución y sus principales características químicas (pH, dureza, temperatura),

— en el caso de una sustancia poco hidrosoluble, método de preparación de la solución madre y de las soluciones de ensayo,

— concentraciones de las eventuales sustancias auxiliares,

— relación de las concentraciones utilizadas y cualquier información disponible sobre la estabilidad, a dichas concentraciones, de la sustancia en la solución de ensayo,

— si se realizan análisis químicos, los métodos utilizados y los resultados obtenidos,

— resultados del ensayo límite, si se ha realizado,

— motivos de la elección y los detalles del procedimiento de ensayo utilizado (por ejemplo, sistema estático, semiestático, dinámico, velocidad de administración, tasa de renovación, aireación o no, carga de peces, etc.),

▼B

— descripción del equipo de ensayo,

— régimen de iluminación,

— concentraciones del oxígeno disuelto, valores de pH y temperaturas de las soluciones de ensayo cada 24 horas,

— pruebas de que se han respetado los criterios de calidad,

— tabla que muestre la mortalidad acumulada para cada concentración y para el testigo (y, en su caso, el testigo con producto auxiliar) para cada uno de los tiempos de observación recomendados,

— representación gráfica de los porcentajes de mortalidad en función de las concentraciones al final del ensayo,

— si es posible, valores de la CL_{50} en cada uno de los tiempos de observación recomendados (límite de confianza del 95 %),

— métodos estadísticos utilizados para determinar los valores de la CL_{50},

— si se utiliza una sustancia de referencia, resultados obtenidos,

— concentración máxima utilizada que no haya causado mortalidad durante el período de ensayo,

— concentración mínima utilizada que haya causado un 100 % de mortalidad durante el período de ensayo.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París 1981, Test Guideline 203, Decisión del Consejo C(81) 30 final, y actualizaciones.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Bracbydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Bracbydanio rerio* Hamilton-Buchanan — Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Suiza, Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasserun- tersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia *reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, *Office of Research and Development*, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Comisión de las Comunidades Europeas, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol.3, 793–821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Il Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink), American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. y Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Apéndice 1

Agua reconstituida

Ejemplo de agua de dilución adecuada

Los productos químicos deben ser de calidad analítica.

El agua debe ser agua destilada de buena calidad, o agua desionizada de una conductividad inferior a 5 μScm^{-1}.

El aparato para la destilación del agua no contendrá ningún componente de cobre.

Soluciones madre

$CaCl_2$. $2H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado): 11,76 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): 4,93 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

$NaHCO_3$ (carbonato ácido de sodio): 2,59 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

KCl (cloruro de potasio): 0,23 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

Agua de dilución reconstituida

Mezclar 25 ml de cada una de las cuatro soluciones madre y completar hasta un litro con agua.

Airear hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea igual al valor de saturación del aire.

El pH debe ser 7,8 ± 0,2.

Si es necesario, ajustado con NaOH (hidróxido de sodio) o HCl (ácido clorhídrico).

El agua de dilución así preparada se deja reposar durante unas 12 horas y no debe ser aireada posteriormente.

La suma de iones Ca/Mg en esta solución es igual a 2,5 mmol/l. La relación de los iones Ca:Mg es de 4:1, la de los iones Na:K de 10:1. La alcalinidad total de esta solución es igual a 0,8 mmol/1.

Cualquier desviación en la preparación del agua de dilución no debe modificar su composición ni sus propiedades.

▼B

Apéndice 2

Especies de peces recomendadas para el ensayo

Especies recomendadas	Intervalo recomendado de temperaturas de ensayo (ºC)	Longitud total recomandada del pez de ensayo (cm)
Bracbydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Pez cebra	20 a 24	3,0 ± 0,5
Pimephales prometas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Pez cabeza gorda	20 a 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpa común	20 a 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodontidae (Tomminck y Schlegel 1850) Medaka	20 a 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 a 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Agallas azules	20 a 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Trucha arco iris	12 a 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Caho	20 a 24	6,0 ± 2,0

Aprovisionamiento

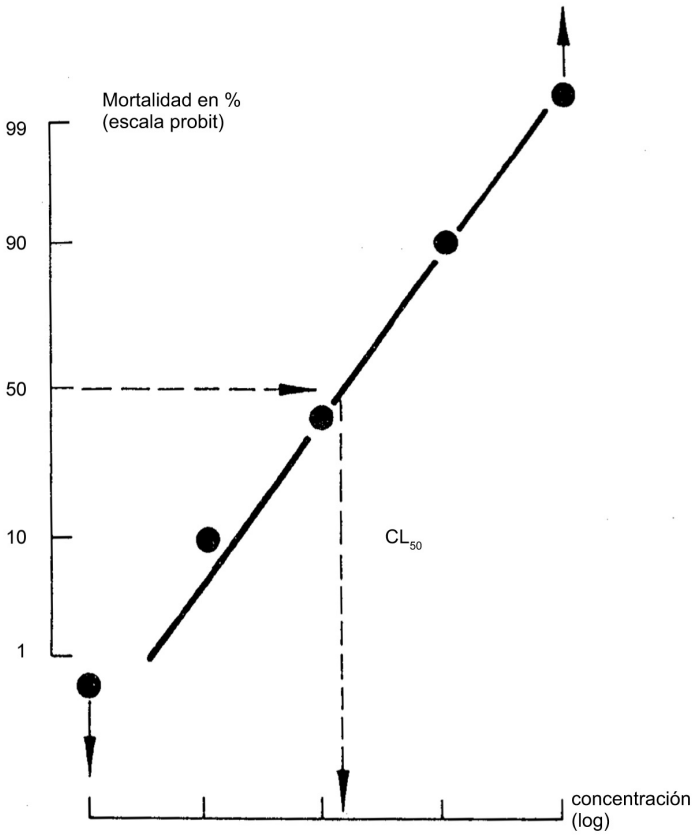
Los peces que se mencionan arriba son fáciles de criar y se puede disponer fácilmente de ellos durante todo el año. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en el laboratorio, en condiciones sanitarias controladas, de forma que el animal que se someta al ensayo esté sano y su origen sea conocido. Estos peces están disponibles en casi todo el mundo.

▼B

Apéndice 3

Ejemplo de curva de procentaje de mortalidad/concentración

Ejemplo de determinación de la CL_{50} en un papel log-probit



▼B

C.2. ENSAYO DE INMOVILIZACIÓN AGUDA DE *DAPHNIA* SP.

1. MÉTODO

El presente método de ensayo de inmovilización aguda es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 202 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método describe un ensayo de toxicidad aguda para evaluar los efectos de las sustancias químicas en los dáfnidos. En la medida de lo posible se han utilizado los métodos de ensayo existentes (1) (2) (3).

1.2. DEFINICIONES

A efectos del presente método, se entenderá por:

«**CE_{50}**»: la concentración estimada que inmoviliza al 50 % de los dáfnidos en un plazo de exposición definido; si se utiliza otra definición, deberá indicarse junto con su referencia,

«**inmovilización**»: la situación de los animales incapaces de nadar en el plazo de 15 segundos tras una agitación suave del recipiente de ensayo (aunque puedan seguir moviendo las antenas).

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se exponen dáfnidos jóvenes, de menos de 24 horas de edad al inicio del ensayo, a una gama de concentraciones de la sustancia problema durante 48 horas. Se registra la inmovilización a las 24 y a las 48 horas, y se compara con los valores de los controles. Se analizan los resultados para calcular la CE_{50} a las 48 horas (véanse las definiciones del punto 1.2). La determinación de la CE_{50} a las 24 horas es optativa.

1.4. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Hay que conocer la solubilidad en agua y la presión de vapor de la sustancia problema; también se debe disponer de un método analítico fiable para cuantificar la sustancia en las soluciones problema con la eficiencia de recuperación y el límite de determinación establecidos. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural de la sustancia problema, su pureza, estabilidad en el agua y a la luz, P_{ow}, y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

Nota: En la referencia (4) se ofrece orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos.

1.5. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Puede estudiarse la CE_{50} de una sustancia de referencia como forma de garantizar la fiabilidad de las condiciones del ensayo. Con este fin se recomienda utilizar sustancias tóxicas empleadas en ensayos interlaboratorios internacionales (1)(5) ([1]). La frecuencia de los ensayos con una sustancia de referencia debe ser preferentemente mensual, y al menos semestral.

([1]) Los resultados de estos ensayos interlaboratorios y unas correcciones técnicas de la norma ISO 6341 indican una CE_{50}-24 h de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) en la banda de 0,6 mg/l a 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITERIOS DE CALIDAD

Para que un ensayo sea válido, los resultados deben cumplir los siguientes criterios:

— en los controles, incluido el que contiene el agente solubilizante, no debe quedar inmovilizado más del 10 % de los dáfnidos,

— la concentración de oxígeno disuelto al final del ensayo debe ser ≥ 3 mg/l en los recipientes de control y de ensayo.

Nota: Respecto al primer criterio, no más del 10 % de los dáfnidos de control pueden presentar inmovilización u otros signos de enfermedad o presión, por ejemplo, decoloración o comportamiento anómalo, como quedar retenidos en la superficie del agua.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1. **Equipo**

Los recipientes de ensayo y demás equipo que hayan de entrar en contacto con las soluciones problema serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Los recipientes de ensayo consistirán normalmente en tubos de ensayo o vasos de precipitados; deben lavarse antes de cada utilización siguiendo procedimientos normalizados de laboratorio. Los recipientes de ensayo deben cubrirse de forma no hermética para reducir la pérdida de agua debida a la evaporación y para evitar la entrada de polvo en las soluciones. Los ensayos con sustancias volátiles deben realizarse en recipientes cerrados y completamente llenos, de volumen suficiente para evitar que el oxígeno llegue a un nivel limitante o demasiado bajo (véanse el punto 1.6 y el párrafo primero del punto 1.8.3).

Además se utilizarán algunos de los instrumentos siguientes o todos ellos: oxigenómetro (con microelectrodo u otro equipo que sea conveniente para medir el oxígeno disuelto en muestras de pequeño volumen), pH-metro, instrumento adecuado para controlar la temperatura, equipo para determinar la concentración de carbono orgánico total (COT), equipo para determinar la demanda química de oxígeno (DQO), aparato para determinar la dureza, etc.

1.7.2. **Organismo de ensayo**

La especie recomendada es *Daphnia magna* Straus, aunque pueden utilizarse en este ensayo otras especies adecuadas de *Daphnia* (por ejemplo, *Daphnia pulex).* Los animales tendrán una edad inferior a 24 horas al principio del ensayo y, para reducir la variabilidad, se recomienda fervientemente que no sean progenie de primera nidada. Han de proceder de una población sana (es decir, sin signos de presión, tales como mortalidad elevada, presencia de machos y efipios, retraso de la producción de la primera nidada, animales decolorados, etc.). Todos los organismos utilizados para un ensayo concreto deben proceder de cultivos establecidos a partir de la misma población de dáfnidos. Los animales del cultivo madre deben mantenerse en condiciones (luz, temperatura, medio) similares a las que se vayan a usar en el ensayo. Si el medio de cultivo de dáfnidos que se va utilizar en el ensayo es diferente del utilizado en cultivos normales de dáfnidos, es adecuado incluir una fase de aclimatación previa al ensayo. Con este objetivo, los dáfnidos de la nidada deben mantenerse en agua de dilución a la temperatura del ensayo durante al menos 48 horas antes del inicio del ensayo.

▼B

1.7.3. **Agua de mantenimiento y de dilución**

Puede utilizarse como agua de mantenimiento y de dilución el agua natural (superficial o subterránea), el agua reconstituida o el agua del grifo desclorada, siempre que los dáfnidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo, aclimatación y ensayo sin mostrar signos de presión. Es adecuada como agua de ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en el anexo 1. La calidad del agua ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. El agua reconstituida puede obtenerse añadiendo al agua desionizada o destilada cantidades específicas de reactivos de pureza analítica reconocida. En el anexo 2 y en las referencias (1) y (6) se dan ejemplos de agua reconstituida. Obsérvese que, para el ensayo de sustancias con metales, ha de evitarse utilizar medios que contengan agentes quelantes conocidos, como los medios M4 y M7 del anexo 2. El pH debe encontrarse en la banda de 6 a 9. La dureza recomendada es de entre 140 y 250 mg/l (en $CaCO_3$) para *Daphnia magna,* pero con otras especies de *Daphnia* también puede ser adecuada una dureza menor. El agua de dilución tiene que airearse antes de su utilización en el ensayo, de forma que la concentración de oxígeno disuelto llegue a la saturación.

Si se utiliza agua natural, deben medirse los parámetros de calidad al menos dos veces al año o siempre que se sospeche la posibilidad de algún cambio significativo en estas características (véanse el párrafo anterior y el anexo 1). Debe medirse también la concentración de metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Si se utiliza agua del grifo desclorada, es recomendable hacer cada día un análisis del cloro. Si el agua de dilución es de una fuente de agua superficial o subterránea, deben medirse la conductividad y el carbono orgánico total (COT) o la demanda química de oxígeno (DQO).

1.7.4. **Soluciones problema**

Las soluciones problema con las concentraciones elegidas se preparan normalmente por dilución de una solución madre. Preferentemente, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia problema en agua de dilución. Debe evitarse, en la medida de lo posible, el uso de disolventes, emulgentes o dispersantes. Sin embargo, estos compuestos pueden ser necesarios en algunos casos para obtener una solución madre a la concentración deseada. En la referencia (4) se dan orientaciones sobre disolventes, emulgentes y dispersantes adecuados. En cualquier caso, la cantidad de sustancia problema contenida en las soluciones problema no debe sobrepasar el límite de solubilidad en el agua de dilución.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si el pH no queda en la banda de 6 a 9, puede realizarse un segundo ensayo en el que se ajuste el pH de la solución madre al del agua de dilución antes de la adición de la sustancia problema. El ajuste del pH debe hacerse de forma que la concentración de la solución madre no cambie de forma significativa y no se produzca ninguna reacción química ni precipitación de la sustancia problema. Las sustancias recomendadas son HCl y NaOH.

▼B

1.8. PROCEDIMIENTO

1.8.1. **Condiciones de exposición**

1.8.1.1. *Grupos de ensayo y controles*

Los recipientes de ensayo se llenan con volúmenes adecuados de agua de dilución y de soluciones de la sustancia problema. La proporción de volumen de aire y de agua en el recipiente debe ser la misma en los grupos de ensayo y de control. A continuación se ponen los dáfnidos en los recipientes de ensayo. Con cada concentración de ensayo y cada control deben utilizarse al menos 20 animales, de preferencia divididos en cuatro grupos de cinco animales cada uno. Para cada animal deben preverse al menos 2 ml de solución problema (es decir, un volumen de 10 ml para cinco dáfnidos en cada recipiente de ensayo). La prueba puede realizarse con un sistema de renovación semiestática o dinámica si no es estable la concentración de la sustancia problema.

Además de la serie de tratamiento, debe utilizarse una serie de control con el agua de dilución y, si procede, otra serie de control con el agente solubilizante.

1.8.1.2. *Concentraciones de ensayo*

Puede efectuarse un experimento previo para determinar la gama de concentraciones que se han de utilizar en el ensayo definitivo, salvo que se disponga de información sobre la toxicidad de la sustancia problema. A tal fin, los dáfnidos se exponen a una serie de concentraciones de la sustancia problema muy diferentes entre sí. Deben exponerse cinco dáfnidos a cada concentración de ensayo durante un máximo de 48 horas, y no es necesario efectuar ninguna prueba en paralelo. Es posible abreviar el plazo de exposición (por ejemplo, a 24 horas o menos) si pueden obtenerse en menos tiempo datos adecuados para los fines del experimento de determinación de la gama de concentraciones.

Se emplearán al menos cinco concentraciones de ensayo, que formarán una progresión geométrica con una razón preferentemente no superior a 2,2. Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. La mayor concentración estudiada debe provocar de preferencia una inmovilización del 100 %, y la menor concentración estudiada no debe provocar de preferencia ningún efecto observable.

1.8.1.3. *Condiciones de incubación*

La temperatura debe estar entre 18 ºC y 22 ºC, y en cada uno de los ensayos debe mantenerse constante, con una variación máxima de ± 1 ºC. Se recomienda un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. También puede aceptarse la oscuridad completa, especialmente si la sustancia problema es inestable a la luz.

Los recipientes de ensayo no deben airearse durante el ensayo. El ensayo se realiza sin ajustar el pH. No se debe proporcionar alimento a los dáfnidos durante el ensayo.

1.8.1.4. *Duración*

La duración del ensayo es de 48 horas.

1.8.2. **Observaciones**

Debe comprobarse si hay dáfnidos inmovilizados en cada recipiente de ensayo a las 24 y 48 horas desde el inicio del ensayo (véanse las definiciones del punto 1.2). Además de la inmovilidad, debe indicarse todo eventual aspecto o comportamiento anormal.

▼B

1.8.3. **Mediciones analíticas**

El oxígeno disuelto y el pH se miden al inicio y al final del ensayo en los recipientes de los controles y en los de la mayor concentración de sustancia problema. La concentración de oxígeno disuelto de los controles debe cumplir el criterio de validez (véase el punto 1.6). El pH no debe variar en principio más de 1,5 unidades en ninguno de los ensayos. La temperatura se suele medir en los recipientes de control o en el aire ambiente y debe registrarse preferentemente de forma continua durante el ensayo o, como mínimo, al inicio y al final del mismo.

La concentración de la sustancia problema debe medirse, como mínimo, en los recipientes con la concentración más elevada y más baja, al principio y al final del ensayo (4). Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia problema se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de ± 20 % de la concentración inicial nominal o medida, los resultados pueden fundarse en estos valores iniciales nominales o medidos.

1.9. ENSAYO LÍMITE

Siguiendo los procedimientos descritos en el presente método, puede efectuarse un ensayo límite con 100 mg/l de sustancia problema o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo, si este es inferior, a fin de demostrar que la CE_{50} es mayor que esta concentración. El ensayo límite debe hacerse utilizando 20 dáfnidos (preferentemente divididos en cuatro grupos de cinco), con igual número en el control o controles. Si se observa alguna inmovilización, debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los eventuales comportamientos anormales observados.

2. **DATOS**

Los datos deben resumirse en forma de cuadro, indicando respecto a cada grupo de tratamiento y de control el número de dáfnidos utilizados y la inmovilización en cada observación. Deben representarse gráficamente los porcentajes de inmovilización a las 24 y 48 horas frente a las concentraciones de sustancia problema. Los datos se analizan mediante métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis de probit, etc.) para calcular las pendientes de las curvas y la CE_{50} con unos límites de confianza del 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Cuando los métodos normales de cálculo de la CE_{50} no sean aplicables a los datos obtenidos, se utilizarán la concentración más elevada que no provoque inmovilidad y la concentración más baja que provoque un 100 % de inmovilidad para estimar la CE_{50}, considerada como la media geométrica de estas dos concentraciones.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

▼B

— identificación química, incluida la pureza.

Especie de ensayo:

— procedencia y especie de *Daphnia,* proveedor original (si se conoce) y condiciones de cultivo utilizadas (con inclusión de la procedencia, el tipo y la cantidad del pienso, así como la frecuencia de la alimentación).

Condiciones de ensayo:

— descripción de los recipientes de ensayo: tipo de recipientes, volumen de solución, número de dáfnidos por recipiente de ensayo, número de recipientes de ensayo (en paralelo) por concentración,

— métodos de preparación de las soluciones madre y problema, incluido el eventual uso de dispersantes; concentraciones utilizadas,

— origen del agua de dilución y características cualitativas del agua (pH, dureza, proporción Ca/Mg, proporción Na/K, alcalinidad, conductividad, etc.); composición del agua reconstituida si se utiliza,

— condiciones de incubación: temperatura, intensidad y periodicidad de la luz, oxígeno disuelto, pH, etc.

Resultados:

— número y porcentaje de dáfnidos inmovilizados o que presentan cualquier efecto nocivo (incluido un comportamiento anormal) en los controles y en cada grupo de tratamiento, en cada momento de observación, y descripción de la naturaleza de los efectos observados,

— resultados y fecha del ensayo efectuado con la sustancia de referencia, si se conocen,

— concentraciones nominales de ensayo y resultados de todos los análisis para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo; también deben indicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de determinación,

— todas las mediciones fisicoquímicas de temperatura, pH y oxígeno disuelto efectuadas durante el ensayo,

— la CE_{50} de inmovilización a las 48 horas, con intervalos de confianza y gráficos del modelo ajustado utilizado para su cálculo, las pendientes de las curvas dosis-respuesta y su error típico, métodos estadísticos utilizados para la determinación de la CE_{50} (también deben indicarse estos datos en relación con la inmovilización a las 24 horas si se han obtenido),

— explicación de las eventuales desviaciones respecto al método de ensayo y de la medida en que afecten a los resultados de ensayo.

4. **REFERENCIAS**

1. ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility *of Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Comisión de las Comunidades Europeas. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. p. 65-84

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Anexo 1

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE

Sustancia	Concentración
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoniaco no ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

▼B

Anexo 2

EJEMPLOS DE AGUA RECONSTITUIDA ACEPTABLE PARA EL ENSAYO

Agua de ensayo iso (1)

Soluciones madre (una sola sustancia)		Para preparar el agua reconstituida, añádanse los volúmenes siguientes de soluciones madre a 1 litro de agua (*)
Sustancia	Cantidad añadida a 1 litro de agua (*)	
Cloruro de calcio $CaCl_2 . 2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfato de magnesio $MgSO_4 . 7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonato de sodio $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Cloruro de potasio KCl	0,23 g	25 ml

(*) Agua de pureza adecuada como, por ejemplo, agua desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa con una conductividad que de preferencia no exceda de 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Medios M7 y M4 de Elendt

Aclimatación a los medios M4 y M7 de Elendt

Algunos laboratorios han tenido dificultades para transferir directamente las dafnias a los medios M4 y M7. Sin embargo, se han obtenido resultados bastante buenos con una aclimatación gradual, esto es, cambiando del medio propio a Elendt al 30 %, luego al 60 % y por último al 100 %. El período de aclimatación necesario puede ser bastante largo, incluso de un mes.

Preparación

Oligoelementos

Se empieza por preparar soluciones madre distintas (I) de cada oligoelemento en agua de pureza apropiada (desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa). A partir de estas soluciones madre (I) se prepara una segunda solución madre única (II) que contiene todos los oligoelementos (solución combinada), de la forma siguiente:

Soluciones madre I (una sola sustancia)	Cantidad añadida al agua (mg/l)	Concentración (en relación con el medio M4)	Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 veces	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 veces	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 veces	1,0	0,25

▼B

Soluciones madre I (una sola sustancia)	Cantidad añadida al agua (mg/l)	Concentración (en relación con el medio M4)	Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 veces	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 veces	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 veces	1,0	0,25
Na_2 $MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 veces	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 veces	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 veces	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 veces	1,0	1,0
KI	65	20 000 veces	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000 veces	1,0	1,0
NH4VO3	11,5	20 000 veces	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000 veces	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 veces	—	—

Las soluciones de Na_2EDTA y $FeSO_4$ se preparan por separado, después se reúnen y se esterilizan en autoclave inmediatamente.

Se obtiene así:

2 l de solución de Fe-EDTA		1 000 veces	20,0	5,0

Medios M4 y M7

Los medios M4 y M7 se preparan a partir de la solución madre II con los macronutrientes y las vitaminas que siguen:

	Cantidad añadida al agua (mg/l)	Concentración (en relación con el medio M4)	Cantidad de solución madre II añadida para preparar el medio (ml/l)	
			M4	M7
Solución madre II (combinación de oligoelementos)		20 veces	50	50
Soluciones madre de macronutrientes (una sola sustancia)				
$CaCl_2$ • $2H_20$	293 800	1 000 veces	1,0	1,0
$MgSO_4$ • $7H_2O$	246 600	2 000 veces	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 veces	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 veces	1,0	1,0
Na_2 SiO_3 • $9H_2O$	50 000	5 000 veces	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 veces	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 veces	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 veces	0,1	0,1

▼B

	Cantidad añadida al agua (mg/l)	Concentración (en relación con el medio M4)	Cantidad de solución madre II añadida para preparar el medio (ml/l)	
			M4	M7
Solución madre de vitaminas combinadas	—	10 000 veces	0,1	0,1
La solución madre de vitaminas combinadas se prepara añadiendo las 3 vitaminas a 1 litro de agua como se indica a continuación:				
Clorhidrato de tiamina	750	10 000 veces		
Cianocobalamina (B12)	10	10 000 veces		
Biotina	7,5	10 000 veces		

La solución madre de vitaminas combinadas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas. Las vitaminas se incorporan a los medios poco antes de usarlos.

Nota: Para evitar la precipitación de sales al preparar los medios completos, se incorporan las partes alícuotas de las soluciones madre a aproximadamente 500-800 ml de agua desionizada y a continuación se completa hasta obtener 1 litro.

Nota: La primera publicación del medio M4 puede encontrarse en Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M1

C.3. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGAS Y CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE

1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 201 (2006) (1).

1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de ensayo se revisan y actualizan periódicamente en función de los avances científicos. Era necesario revisar el método de ensayo C.3 para incluir más especies y para ajustarlo a los requisitos de evaluación del peligro y clasificación de sustancias químicas. La revisión se ha efectuado basándose en la amplia experiencia práctica, en los avances científicos en el campo de los estudios toxicológicos de las algas y en la amplia aplicación de la normativa que ha tenido lugar desde la adopción inicial.

1.2. DEFINICIONES

En relación con el presente método de ensayo se entenderá por:

Biomasa: el peso seco de materia viva presente en una población y expresado en términos de un volumen dado como, por ejemplo, mg de algas/litro de solución problema. Generalmente, la «biomasa» se define como masa, pero en este ensayo la palabra se refiere a masa por volumen. También en este ensayo, lo que se mide normalmente son indicadores de la biomasa, como recuentos celulares, fluorescencia, etc., por lo que el término de «biomasa» se refiere también a estos indicadores.

Coeficiente de variación: una medida adimensional de la variabilidad de un parámetro, definida como el cociente entre la desviación típica y la media. Puede expresarse también como valor porcentual. El valor promedio del coeficiente de variación de una tasa media de crecimiento específico en cultivos de control replicados (en paralelo) debe calcularse de la manera siguiente:

1. Se calcula el CV porcentual de una tasa media de crecimiento específico a partir de las tasas de crecimiento diarias/de cada sección en las réplicas respectivas.

2. Se calcula el valor medio de todos los valores calculados según el punto 1 para obtener el coeficiente medio de variación de la tasa de crecimiento específico diaria/de cada sección en las réplicas de los cultivos de control.

EC_x: la concentración de la sustancia problema disuelta en el medio de ensayo que produce una reducción del x % (por ejemplo, del 50 %) en el crecimiento del organismo de ensayo dentro de un plazo de exposición definido (que debe indicarse explícitamente si es distinto de la duración completa o normal del ensayo). Para expresar de forma inequívoca el valor de EC obtenido a partir de la tasa de crecimiento o del rendimiento, se usan respectivamente los símbolos «EC_t» y «EC_r».

Medio de crecimiento: el medio de cultivo sintético y completo en que crecen las algas del ensayo cuando se exponen a la sustancia problema. Esta se disuelve en principio en el medio de ensayo.

Tasa de crecimiento (tasa media de crecimiento específico): el aumento logarítmico de la biomasa durante el período de exposición.

▼M1

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): la concentración estudiada mínima a la que se observa que la sustancia ejerce un efecto estadísticamente significativo de reducción del crecimiento (con $p < 0,05$) cuando se compara con el control, dentro de un tiempo dado de exposición. Sin embargo, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de ejercer un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

Concentración sin efecto observado (NOEC): la concentración estudiada que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

Variable de respuesta: una variable para la estimación de la toxicidad derivada de cualquier parámetro medido que describa la biomasa por distintos métodos de cálculo. A efectos del presente método, las tasas de crecimiento y el rendimiento son variables de respuesta obtenidas midiendo la biomasa directamente o bien mediante alguno de los indicadores mencionados.

Tasa de crecimiento específico: una variable de respuesta definida como el cociente de la diferencia de los logaritmos naturales de un parámetro de observación (en el presente método de ensayo, la biomasa) y el respectivo plazo de tiempo.

Rendimiento: el valor de una variable de medición al final del período de exposición menos el valor de la variable de medición al inicio del período de exposición; indica el aumento de biomasa durante el ensayo.

1.3. APLICABILIDAD DEL ENSAYO

Este método de ensayo se aplica más fácilmente a las sustancias hidrosolubles que, en las condiciones del ensayo, tienen probabilidad de permanecer en el agua. Para el ensayo de sustancias volátiles, que se adsorben fuertemente, coloreadas, poco hidrosolubles o que pueden afectar a la disponibilidad de nutrientes o minerales en el medio de ensayo, puede ser necesario modificar el procedimiento descrito (por ejemplo, sistema cerrado, acondicionamiento de los recipientes de ensayo). En (2), (3) y (4) se dan orientaciones sobre algunas modificaciones pertinentes.

1.4. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El objeto de este ensayo es determinar los efectos de una sustancia sobre el crecimiento de microalgas o cianobacterias de agua dulce. Los organismos del ensayo, en fase de crecimiento exponencial, se exponen a la sustancia problema en cultivos discontinuos, normalmente durante un plazo de 72 horas. A pesar de la relativamente reducida duración del ensayo, es posible evaluar los efectos sobre varias generaciones.

La respuesta del sistema es la reducción del crecimiento en una serie de cultivos de algas (unidades de ensayo) expuestos a distintas concentraciones de una sustancia problema. La respuesta se evalúa como función de la concentración de exposición comparándola con el crecimiento medio en cultivos de control (sin exposición) replicados. Para que se exprese plenamente la respuesta del sistema a los efectos tóxicos (sensibilidad óptima), se permite que los cultivos crezcan exponencialmente sin ninguna restricción, con la presencia de suficientes nutrientes y luz continua durante un tiempo suficiente para medir la reducción de la tasa de crecimiento específico.

▼M1

El crecimiento y su inhibición se cuantifican midiendo la biomasa de las algas en función del tiempo. La biomasa de las algas se define como el peso seco por volumen, por ejemplo mg de algas/litro de solución problema. Sin embargo, es difícil medir el peso seco, por lo que se utilizan parámetros indicadores, de los que los más utilizados son los recuentos celulares. Otros indicadores son el volumen celular, la fluorescencia, la densidad óptica, etc. Debe disponerse de un factor de conversión entre el indicador y la biomasa.

El criterio del ensayo es la inhibición del crecimiento, expresado como aumento logarítmico de la biomasa (tasa media de crecimiento específico) durante el tiempo de exposición. A partir de las tasas medias de crecimiento específico registradas con una serie de soluciones problema, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % de la tasa de crecimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como EC_{tx} (por ejemplo, EC_{t50}).

Para la aplicación del presente método en el marco normativo comunitario, el cálculo de los resultados debe basarse en una tasa media de crecimiento específico por los motivos recogidos en el punto 2.2. Otra variable de respuesta utilizada en este método de ensayo es el rendimiento, lo que puede ser necesario para cumplir obligaciones normativas específicas en algunos países. Se define como la biomasa al final del tiempo de exposición menos la biomasa al inicio de este tiempo. A partir del rendimiento registrado en una serie de soluciones problema, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % del rendimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como EC_{rx} (por ejemplo, EC_{r50}).

Además, pueden determinarse estadísticamente la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC).

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Entre la información sobre la sustancia problema que puede ser útil para establecer las condiciones del ensayo, figuran su fórmula estructural, pureza, estabilidad ante la luz, estabilidad en las condiciones del ensayo, propiedades de absorción de la luz, pKa y resultados de estudios de transformación, incluida la biodegradabilidad en el agua.

Deben conocerse la hidrosolubilidad, el coeficiente de reparto octanol/agua (P_{ow}) y la presión de vapor de la sustancia problema, y un método validado para cuantificar la sustancia en las soluciones problema con una eficiencia de recuperación y un límite de detección establecidos.

1.6. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Para comprobar el procedimiento del ensayo pueden someterse a ensayo sustancias de referencia, como el 3,5-diclorofenol utilizado en el ensayo de intercalibración internacional (4). También puede utilizarse el dicromato de potasio como sustancia de referencia con algas verdes. Es aconsejable someter a ensayo una sustancia de referencia al menos dos veces al año.

1.7. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que un ensayo sea válido, su realización debe cumplir los siguientes criterios:

▼M1

— La biomasa de los cultivos de control debe haber aumentado exponencialmente con un factor de al menos 16 en el plazo de las 72 horas del ensayo. Esto corresponde a una tasa de crecimiento específico de 0,92 días^{-1}. Con las especies más utilizadas, la tasa de crecimiento suele ser mucho mayor (véase el apéndice 1). Este criterio puede no cumplirse cuando se utilizan especies de crecimiento más lento que las indicadas en el apéndice 1. En tal caso, debe prolongarse el plazo de ensayo hasta obtener un crecimiento por un factor de al menos 16 en los cultivos de control, siendo exponencial el crecimiento durante todo este tiempo. El plazo de ensayo puede reducirse hasta un mínimo de 48 horas para mantener el crecimiento exponencial sin límites durante el ensayo, siempre que se cumpla el requisito de un factor de multiplicación mínimo de 16.

— El coeficiente promedio de variación de las tasas de crecimiento específico de cada sección (días 0-1, 1-2 y 2-3, en caso de ensayo de 72 horas) en los cultivos de control (véase «Coeficiente de variación» en el punto 1.2) no debe pasar del 35 %. Para el cálculo de la tasa de crecimiento específico de cada sección, véase el párrafo segundo del punto 2.2.1. Este criterio se aplica al valor promedio de los coeficientes de variación calculados de los cultivos de control replicados.

— El coeficiente de variación de las tasas medias de crecimiento específico durante toda la duración del ensayo en los cultivos de control replicados no debe superar el 7 % en ensayos con *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Desmodesmus subspicatus*. Con otras especies menos utilizadas, el valor no debe superar el 10 %.

1.8. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.8.1. **Equipo**

Los recipientes de ensayo y demás dispositivos que hayan de entrar en contacto con las soluciones problema serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Todos los artículos se lavarán cuidadosamente para que no tengan contaminantes orgánicos ni inorgánicos que puedan interferir con el crecimiento de las algas o con los componentes de las soluciones problema.

Los recipientes de ensayo serán en principio matraces de vidrio de dimensiones que permitan acoger un volumen suficiente de cultivo para la realización de mediciones durante el ensayo y la entrada de una masa suficiente de CO_2 desde la atmósfera (véase el párrafo segundo del punto 1.8.9). Téngase en cuenta que el volumen de líquido debe ser suficiente para que se efectúen las determinaciones analíticas (véase el párrafo quinto del punto 1.8.11).

Además, hará falta el siguiente equipo, en todo o en parte:

— Dispositivo de cultivo se recomienda una cámara o recinto en que se pueda mantener la temperatura elegida de incubación con una precisión de 2 °C.

— Instrumentos de medición de la luz: es importante tener en cuenta que el método de medición de la intensidad de la luz y, en particular, el tipo de receptor (colector) afectan al valor medido. Las mediciones deben hacerse preferentemente utilizando un receptor esférico (4 π) (que responda a la luz directa y reflejada desde todos los ángulos por encima y por debajo del plano de medición) o un receptor 2 π (que responda a la luz desde todos los ángulos por encima del plano de medición).

▼M1

— Dispositivo para determinar la biomasa de las algas. El recuento celular, que es el indicador más utilizado para determinar la biomasa de las algas, puede obtenerse con un contador electrónico de partículas, un microscopio con cámara de recuento, o un citómetro de flujo. Es posible medir otros indicadores con un citómetro de flujo, un fluorímetro, un espectrofotómetro o un colorímetro. Es útil calcular un factor de conversión que relacione el recuento celular con el peso seco. Para obtener mediciones útiles también con bajas concentraciones de biomasa cuando se utiliza un espectrofotómetro, puede ser necesario utilizar cubetas con un paso de luz de 4 cm como mínimo.

1.8.2. **Organismos de ensayo**

Pueden utilizarse diversas especies de microalgas y cianobacterias sueltas. Se ha visto que las cepas citadas en el apéndice 1 son adecuadas para el procedimiento especificado en este método de ensayo.

Si se utilizan otras especies, debe mencionarse en el informe el nombre o el origen de las cepas. Ha de confirmarse que el crecimiento exponencial de las algas seleccionadas puede mantenerse durante toda la duración del ensayo en las condiciones reinantes.

1.8.3. **Medio de cultivo**

Se recomiendan dos medios de cultivo: el medio de la OCDE y el medio AAP. Sus composiciones se muestran en el apéndice 2. Téngase en cuenta que el valor inicial de pH y la capacidad de tamponamiento (regulación del aumento del pH) son diferentes en los dos medios. Por tanto, los resultados de los ensayos pueden ser diferentes según el medio utilizado, en particular cuando se estudien sustancias que se ionizan.

Puede ser necesario modificar los medios de cultivo en ciertos casos, por ejemplo para estudiar metales y agentes quelantes o para efectuar el ensayo a diferentes valores de pH. Si se modifica un medio es necesario describir pormenorizadamente y justificar la modificación (3) (4).

1.8.4. **Concentración inicial de biomasa**

La biomasa inicial de los cultivos de ensayo debe ser la misma en todos ellos y lo bastante baja para que pueda darse crecimiento exponencial a lo largo de todo el período de incubación sin peligro de que se agoten los nutrientes. La biomasa inicial no debe superar los 0,5 mg/l en peso seco. Se recomiendan las siguientes concentraciones celulares al inicio:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3 a 10^4	células/ml
Desmodesmus subspicatus	2 a 5×10^3	células/ml
Navicula pelliculosa	10^4	células/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	células/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4 a 10^5	células/ml

1.8.5. **Concentraciones de la sustancia problema**

Se pueden efectuar pruebas preliminares para determinar el intervalo de concentraciones en el que es previsible que ocurran los efectos. Para el ensayo definitivo, deben seleccionarse al menos cinco concentraciones dispuestas en una progresión geométrica de razón no superior a 3,2. En caso de sustancias problema que presenten una curva concentración-respuesta plana, puede justificarse una razón más elevada. La serie de concentraciones debe abarcar preferentemente el intervalo que provoca una inhibición del 5 a 75 % de la tasa de crecimiento de las algas.

▼M1

1.8.6. **Réplicas y controles**

Cada concentración de ensayo contará con tres réplicas. Si no es necesario determinar la NOEC, el diseño de la prueba puede modificarse para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración. El número de réplicas de control debe ser como mínimo de tres, aunque se recomienda que sea el doble del número de réplicas utilizadas con cada concentración de ensayo.

Puede prepararse una serie aparte de soluciones problema para efectuar las determinaciones analíticas de las concentraciones de la sustancia problema (véanse los párrafos cuarto y sexto del punto 1.8.11).

Cuando se utiliza un disolvente para solubilizar la sustancia problema, el diseño del ensayo debe incluir controles adiciones con el disolvente a la misma concentración utilizada en los cultivos de ensayo.

1.8.7. **Preparación del cultivo del inóculo**

Para adaptar las algas a las condiciones del ensayo y garantizar que se encuentran en fase de crecimiento exponencial cuando se utilicen para inocular las soluciones problema, debe prepararse un cultivo de inóculo en el medio de ensayo de 2 a 4 días antes del inicio del ensayo. La biomasa de las algas debe ajustarse para que haya crecimiento exponencial en el cultivo de inóculo hasta que empiece el ensayo. El cultivo de inóculo se incubará en las mismas condiciones que los cultivos de ensayo. Ha de medirse el aumento de la biomasa en el cultivo de inóculo para asegurarse de que el crecimiento está en el intervalo normal de la cepa utilizada en las condiciones de cultivo aplicadas. En el apéndice 3 se describe un ejemplo de procedimiento de cultivo de algas. Para evitar divisiones celulares sincrónicas durante el ensayo, puede ser necesario efectuar una segunda fase de propagación del cultivo de inóculo.

1.8.8. **Preparación de las soluciones problema**

Todas las soluciones problema deben contener las mismas concentraciones de medio de cultivo y la misma biomasa inicial de algas. Las soluciones problema de las concentraciones elegidas se preparan normalmente mezclando una solución madre de la sustancia problema con medio de cultivo y con cultivo de inóculo. En principio, estas soluciones madre se preparan disolviendo la sustancia en medio de ensayo.

Pueden utilizarse disolventes (por ejemplo, acetona, alcohol *t*-butílico y dimetil-formamida) como vehículo para añadir al medio de ensayo sustancias poco hidrosolubles (2) (3). La concentración del disolvente no debe superar los 100 µl/l, y debe ser igual en todos los cultivos (incluidos los controles) de la serie de ensayo.

1.8.9. **Incubación**

Los recipientes de ensayo deben taparse con tapones permeables al aire. Se agitan los recipientes y se colocan en el dispositivo de cultivo. Durante el ensayo es necesario mantener las algas en suspensión y facilitar el paso del CO_2, por lo que debe efectuarse una agitación constante. Los cultivos han de mantenerse a una temperatura entre 21 y 24 °C, con variaciones máximas de 2 °C. En caso de especies distintas de las indicadas en el apéndice 1 como, por ejemplo, especies tropicales, puede ser apropiada una temperatura superior, siempre que se puedan cumplir los criterios de validez. Se recomienda distribuir aleatoriamente los matraces en la incubadora y cambiarlos de posición cada día.

▼M1

El pH del medio de control no debe subir más de 1,5 unidades durante el ensayo. En caso de metales y compuestos que se ionicen parcialmente a un pH próximo al del ensayo, puede ser necesario limitar la variación de pH para obtener unos resultados reproducibles y bien definidos. Técnicamente puede conseguirse una variación < 0,5 unidades de pH procurando una entrada suficiente de CO_2 a la solución problema desde la atmósfera ambiente, por ejemplo, aumentando la intensidad de la agitación. Otra posibilidad es contener la demanda de CO_2 reduciendo la biomasa inicial o la duración del ensayo.

La superficie en que se incuban los cultivos debe recibir una iluminación fluorescente uniforme, por ejemplo, del tipo «blanca fría» o «diurna». Las necesidades de luz de las algas y cianobacterias varían con la cepa. Debe seleccionarse la intensidad de la luz que sea más adecuada para el organismo utilizado en el ensayo. Si se utilizan las especies recomendadas de algas verdes, la intensidad luminosa al nivel de las soluciones problema debe estar en el intervalo de 60 a 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ cuando se mide en la banda de longitudes de onda correspondiente a la fotosíntesis (400-700 nm) utilizando un receptor adecuado. Algunas especies, en particular *Anabaena flos-aquae*, crecen bien con intensidades luminosas más bajas y pueden sufrir daños con intensidades superiores. Para tales especies debe elegirse una intensidad luminosa media en el intervalo de 40 a 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Con instrumentos de medición de la luz calibrados en luxes, una gama equivalente de 4 440 a 8 880 lux con luz blanca fría corresponde aproximadamente a la intensidad luminosa recomendada de 60 a 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). La intensidad luminosa no debe variar en más del 15 % respecto a la intensidad luminosa media en toda la superficie de incubación.

1.8.10. **Duración del ensayo**

La duración del ensayo es en principio de 72 horas. Sin embargo, pueden elegirse duraciones más largas o más breves, siempre que se puedan cumplir los criterios de validez del punto 1.7.

1.8.11. **Mediciones y determinaciones analíticas**

La biomasa de las algas de cada matraz se determina al menos una vez al día mientras dure el ensayo. Si se toman con pipeta pequeños volúmenes de la solución problema para efectuar mediciones, dichos volúmenes no deben reponerse.

La medición de la biomasa se efectúa por recuento manual de células con microscopio o bien con un contador electrónico de partículas (por recuento de células o biovolumen). Pueden utilizarse otras técnicas como, por ejemplo, la citometría de flujo, la fluorescencia clorofílica *in vitro* o *in vivo* (6) (7), o la densidad óptica, siempre que se pueda demostrar una correlación satisfactoria con la biomasa en todo el intervalo de biomasas correspondiente al ensayo.

El pH de las soluciones debe medirse tanto al principio como al final del ensayo.

Siempre que se disponga de un método analítico para la determinación de la sustancia problema en el intervalo de concentraciones utilizadas, debe procederse a analizar las soluciones problema para verificar las concentraciones iniciales y el mantenimiento de las concentraciones de exposición durante el ensayo.

▼M1

Puede ser suficiente analizar la concentración de la sustancia problema al inicio y al final del ensayo a una concentración de ensayo baja y otra alta, así como a una concentración próxima a la EC_{50} prevista, si es probable que las concentraciones de exposición varíen durante el ensayo en menos del 20 % respecto a sus valores nominales. Se recomienda el análisis a todas las concentraciones de ensayo al inicio y al final del ensayo si es poco probable que permanezcan en la banda del 80 a 120 % de su valor nominal. En caso de sustancias problema que sean volátiles, inestables o se adsorban fuertemente, se recomienda tomar muestras adicionales para analizarlas a intervalos de 24 horas durante el período de exposición, a fin de definir mejor las pérdidas de sustancia problema. Con estas sustancias se necesitarán más réplicas. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de la sustancia problema solo tendrá que efectuarse en uno de los recipientes replicados de cada concentración de ensayo (o en los contenidos reunidos de los recipientes replicados).

Los medios de ensayo preparados específicamente para el análisis de las concentraciones de exposición durante el ensayo se tratarán de la misma forma que los empleados para el ensayo, es decir, se inocularán con algas y se incubarán en condiciones idénticas. Si hace falta analizar la concentración de la sustancia problema disuelta, puede ser necesario separar las algas del medio. Se recomienda hacer la separación por centrifugación con una fuerza *g* baja, suficiente para sedimentar las algas.

Si está demostrado que la concentración de la sustancia problema se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo de 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, el análisis de los resultados puede basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación respecto a la concentración nominal o medida inicialmente es superior al 20 %, el análisis de los resultados debe basarse en la media geométrica de la concentración durante la exposición o en modelos que describan el descenso de la concentración de la sustancia problema (3) (8).

El ensayo de inhibición del crecimiento de las algas es un sistema más dinámico que la mayoría de los otros ensayos de toxicidad acuática a corto plazo. En consecuencia, puede ser difícil definir las concentraciones reales de exposición, especialmente cuando se estudian a baja concentración sustancias que se adsorben. En tales casos, la desaparición de la sustancia de la solución por su adsorción a la biomasa de las algas en aumento no significa que se haya separado del sistema de ensayo. Cuando se analiza el resultado del ensayo, debe comprobarse si un descenso en la concentración de la sustancia problema a lo largo del ensayo va acompañado por un descenso de la inhibición del crecimiento. En caso afirmativo, puede estudiarse la aplicación de un modelo adecuado que describa el descenso de la concentración de la sustancia problema (8). En caso negativo, puede ser adecuado basar el análisis de los resultados en las concentraciones iniciales (nominales o medidas).

1.8.12. **Otras observaciones**

Debe procederse a una observación microscópica para verificar que el aspecto del cultivo del inóculo es normal y sano y detectar un eventual aspecto anormal de las algas (que podría ser debido a la exposición a la sustancia problema) al final del ensayo.

▼M1

1.8.13. **Ensayo límite**

Bajo ciertas circunstancias, por ejemplo cuando un ensayo preliminar indica que la sustancia problema no tiene efectos tóxicos a concentraciones de hasta 100 $mg \cdot l^{-1}$, o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo si este valor es más bajo, puede efectuarse un ensayo límite comparando las respuestas de un grupo de control y de un único grupo de tratamiento (100 $mg \cdot l^{-1}$ o una concentración igual al límite de solubilidad). Se recomienda vivamente que esto se apoye en un análisis de la concentración de exposición. Todas las condiciones de ensayo y criterios de validez antes descritos son aplicables al ensayo límite, con la excepción de que el número de réplicas de tratamiento ha de ser como mínimo seis. Las variables de respuesta en el grupo de control y en el de tratamiento pueden analizarse mediante un estudio estadístico para comparar las medias, por ejemplo, una prueba t de Student. Si las varianzas de los dos grupos son desiguales, debe procederse a una prueba t ajustada para varianzas desiguales.

1.8.14. **Modificación para sustancias fuertemente coloreadas**

La irradiación (intensidad de la luz) debe estar en el extremo superior de la banda establecida en el presente método de ensayo: 120 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ como mínimo.

El paso de luz debe acortarse reduciendo el volumen de las soluciones problema (en la banda de 5 a 25 ml).

Debe aplicarse una agitación suficiente (por ejemplo, sacudiendo de forma moderada) a fin de que sea elevada la frecuencia de exposición de las algas a la alta irradiación en la superficie del cultivo.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRAZADO DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

La biomasa en los recipientes de ensayo puede expresarse en unidades del indicador utilizado para la medición (por ejemplo, número de células, fluorescencia).

Ha de ponerse en un cuadro la concentración estimada de biomasa en los cultivos de ensayo y en los controles, junto con las concentraciones de la sustancia problema y los tiempos de las mediciones, registrados con una resolución mínima de horas completas, para trazar las curvas de crecimiento. En esta primera fase pueden ser útiles tanto las escalas logarítmicas como las lineales, pero las logarítmicas son obligatorias y en general presentan mejor las variaciones del crecimiento durante el período de ensayo. Téngase en cuenta que el crecimiento exponencial da una línea recta cuando se representa en escala logarítmica, y que la inclinación de la línea (pendiente) indica la tasa de crecimiento específico.

Utilizando las gráficas, ha de comprobarse si los cultivos de control crecen durante todo el ensayo exponencialmente y a la tasa prevista. Deben examinarse críticamente todos los puntos de datos y el aspecto de las gráficas, y ha de comprobarse que no hay errores en los datos en bruto ni en los procedimientos. Se deben comprobar en particular los puntos que parezcan desviarse por un error sistemático. Si está claro que puede señalarse o considerarse muy probable que haya habido errores de procedimiento, el punto concreto se marcará como anómalo y no se incluirá en el posterior análisis estadístico. (Una concentración de algas igual a cero en uno de dos o tres recipientes replicados puede indicar que el recipiente no se había inoculado correctamente, o se había limpiado mal.) En el informe del ensayo deben constar claramente los motivos para rechazar un punto por ser anómalo. Los motivos aceptados son solo los errores de procedimiento (raros), y no simplemente una mala precisión. Los métodos estadísticos para la detección de valores anómalos tienen una utilidad limitada con este tipo de problema y no pueden sustituir al juicio experto. Es preferible mantener los valores anómalos (señalados como tales) entre los puntos recogidos en cualquier presentación posterior de datos en forma de gráfica o de cuadro.

▼M1

2.2. VARIABLES DE RESPUESTA

El objetivo del ensayo es determinar los efectos de la sustancia problema sobre el crecimiento de las algas. El presente método de ensayo describe dos variables de respuesta, ya que los Estados miembros tienen distintas preferencias y necesidades normativas. Para que los resultados del ensayo sean aceptables en todos los Estados miembros, los efectos deben evaluarse utilizando las dos variables de respuesta a) y b) que se describen a continuación:

a) Tasa media de crecimiento específico: esta variable de respuesta se calcula basándose en el aumento logarítmico de la biomasa durante el período de ensayo, expresado por día.

b) Rendimiento: esta variable de respuesta es la biomasa al final del ensayo menos la biomasa al inicio.

Para la aplicación del presente método en el marco normativo comunitario, el cálculo de los resultados debe basarse en una tasa media de crecimiento específico por los motivos recogidos a continuación. Ha de señalarse que los valores de toxicidad calculados a partir de estas dos variables de respuesta no son comparables y es necesario reconocer esta diferencia cuando se utilicen los resultados del ensayo. Los valores de EC_x basados en la tasa media de crecimiento específico (EC_{tx}) son normalmente más elevados que los basados en el rendimiento (EC_{rx}) si se respetan las condiciones del presente método de ensayo, debido al fundamento matemático de los planteamientos respectivos. Esto no debe interpretarse como una diferencia en la sensibilidad de las dos variables de respuesta, sino como una diferencia puramente matemática entre los valores. El concepto de tasa media de crecimiento específico se basa en el modelo general de crecimiento exponencial de las algas en cultivos no limitados, en los que la toxicidad se estima en función de los efectos sobre la tasa de crecimiento, sin depender del nivel absoluto de la tasa de crecimiento específico del control, de la pendiente de la curva concentración-respuesta ni de la duración del ensayo. Por el contrario, los resultados basados en la variable de respuesta «rendimiento» dependen de todas estas otras variables. La EC_{rx} depende de la tasa de crecimiento específico de la especie de algas utilizada en cada ensayo y de la tasa máxima de crecimiento específico, que puede variar de una especie a otra e incluso de una cepa a otra. Esta variable de respuesta no debe utilizarse para comparar la sensibilidad de distintas especies o incluso distintas cepas ante un agente tóxico. Aunque científicamente se prefiere el uso de la tasa media de crecimiento específico para estimar la toxicidad, en el presente método de ensayo se incluye también la estimación a partir del rendimiento para cumplir los requisitos normativos vigentes en ciertos países.

2.2.1. **Tasa media de crecimiento**

La tasa media de crecimiento específico durante un período determinado se calcula como el incremento logarítmico de la biomasa en cada uno de los recipientes de control y de tratamiento, mediante la siguiente ecuación.

$$\mu_{i\text{-}j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (día}^{-1}\text{)}$$

donde:

$\mu_{i\text{-}j}$ es la tasa media de crecimiento específico entre el tiempo *i* y el *j*;

X_i es la biomasa en el tiempo *i*;

X_j es la biomasa en el tiempo *j*.

▼M1

Respecto a cada grupo de tratamiento y de control ha de calcularse un valor medio de la tasa de crecimiento y una estimación de la varianza.

La tasa media de crecimiento específico a lo largo de toda la duración del ensayo (en principio, días 0-3) se calcula utilizando como valor inicial la biomasa teórica inoculada en vez de un valor inicial medido, ya que de esta manera puede obtenerse normalmente una precisión mayor. Si el dispositivo utilizado para medir la biomasa permite determinar con suficiente precisión la pequeña biomasa del inóculo (por ejemplo, citómetro de flujo), entonces podrá utilizarse la concentración medida de la biomasa inicial. También se determinará la tasa de crecimiento de cada sección, calculada como las tasas de crecimiento específico de cada día durante la realización del ensayo (días 0-1, 1-2 y 2-3) y se examinará si la tasa de crecimiento de los controles permanece constante (véanse los criterios de validez, punto 1.7). Si la tasa de crecimiento específico del día uno es significativamente más baja que la tasa media de crecimiento específico, es posible que haya un tiempo de latencia. Aunque es posible minimizar y eliminar prácticamente el tiempo de latencia en los cultivos de control mediante la propagación adecuada de un cultivo previo, un tiempo de latencia en los cultivos de tratamiento puede indicar que se produce una recuperación tras la agresión tóxica inicial o una reducción de la exposición por una pérdida de sustancia problema (incluida la sorción en la biomasa de las algas) tras la exposición inicial. Por tanto, puede considerarse la tasa de crecimiento de cada sección para evaluar el efecto de la sustancia problema presente durante el período de exposición. Una diferencia importante entre la tasa de crecimiento de cada sección y la tasa media de crecimiento indica que hay una desviación respecto al crecimiento exponencial constante y que han de examinarse con detalle las curvas de crecimiento.

El porcentaje de inhibición en tasa de crecimiento de cada réplica de tratamiento se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

donde:

$\%I_t$ es el porcentaje de inhibición en tasa media de crecimiento específico;

μ_C es el valor promedio de la tasa media de crecimiento específico (μ) en el grupo de control;

μ_T es la tasa media de crecimiento específico en la réplica de tratamiento.

Si se utilizan disolventes en la preparación de las soluciones problema, para el cálculo del porcentaje de inhibición deben emplearse controles con disolvente en vez de controles sin disolvente.

2.2.2. **Rendimiento**

El rendimiento se calcula restando a la biomasa presente al final del ensayo la biomasa inicial en cada recipiente de los controles y de los tratamientos. Respecto a cada grupo de tratamiento y de control ha de calcularse un valor promedio del rendimiento y una estimación de la varianza. El porcentaje de inhibición en rendimiento ($\%I_y$) puede calcularse de la manera siguiente con cada réplica de tratamiento:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼**M1**

donde:

$\%\ I_r$ es el porcentaje de inhibición en rendimiento;

Y_C es el valor promedio del rendimiento en el grupo de control;

Y_T es el valor del rendimiento en la réplica de tratamiento.

2.3. TRAZADO DE LA CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA

Se representa el porcentaje de inhibición frente al logaritmo de la concentración de sustancia problema y se examina la representación, desechando los datos que se hayan marcado como anómalos en la primera fase. Se ajusta una línea suave a los puntos correspondientes a los datos, manualmente o mediante interpolación con ordenador, para obtener una primera impresión de la relación concentración-respuesta; después se aplica un método más detallado, de preferencia uno estadístico informatizado. En función del uso previsto de los datos, la calidad (precisión) y la cantidad de los mismos, así como la disponibilidad de herramientas de análisis, puede decidirse (y a veces justificarse plenamente) terminar en esta fase el análisis de los datos para leer simplemente las cifras clave EC_{50} y EC_{10} (o EC_{20}) a partir de la curva ajustada visualmente (véase también el punto siguiente sobre los efectos de estimulación). Pueden considerarse válidas las siguientes razones para no utilizar un método estadístico:

— Los datos no son adecuados para producir, con métodos informatizados, resultados más fiables que los obtenidos por el juicio experto; en tales situaciones, algunos programas informáticos pueden incluso no proporcionar una solución fiable (las iteraciones pueden no converger, etc.).

— Las respuestas de estimulación del crecimiento no pueden tratarse adecuadamente con los programas informáticos disponibles (véase más abajo).

2.4. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

El objetivo es obtener una relación cuantitativa concentración-respuesta mediante análisis de regresión. Es posible utilizar una regresión lineal ponderada después de haber efectuado una linealización de los datos de respuesta como, por ejemplo, en probit o logit o unidades Weibull (9), pero son preferibles los procedimientos de regresión no lineal porque con ellos se tratan mejor las inevitables irregularidades de los datos y las desviaciones respecto a distribuciones suaves. Si la inhibición está próxima al 0 o al 100 %, la transformación puede magnificar tales irregularidades, interfiriendo así con el análisis (9). Debe señalarse que los métodos normales de análisis que utilizan las transformaciones en probit, logit o de Weibull están previstos para aplicarse a datos cuantales (por ejemplo, mortalidad o supervivencia), y que es necesario modificarlos para aplicarlos a datos de crecimiento o biomasa. En (10), (11) y (12) pueden encontrarse métodos específicos de determinación de los valores de EC_x a partir de datos continuos. En el apéndice 4 se da más información sobre el uso de análisis de regresión no lineal.

▼M1

Respecto a cada variable de respuesta que haya de analizarse, se utilizará la relación concentración-respuesta para calcular estimaciones puntuales de los valores de EC_x. Cuando sea posible, se determinarán los límites de confianza del 95 % de cada estimación. La bondad del ajuste de los datos de respuesta al modelo de regresión se evaluará de forma gráfica o estadística. El análisis de regresión se efectuará utilizando las respuestas de las distintas réplicas y no los promedios de los grupos de tratamiento. Si, no obstante, es difícil o imposible el ajuste de una curva no lineal, debido a una dispersión demasiado grande de los datos, el problema puede evitarse efectuando la regresión con promedios de grupos como forma práctica de reducir la influencia de los valores anómalos sospechados. El recurso a esta opción debe indicarse en el informe del ensayo como desviación del procedimiento normal porque el ajuste de la curva con los valores de las distintas réplicas no llevaba a un buen resultado.

Las estimaciones de la EC_{50} y los límites de confianza pueden obtenerse también utilizando la interpolación lineal con remuestreo (*bootstrapping*) (13) si los métodos o modelos de regresión disponibles no son adecuados para los datos.

Para la estimación de los valores de LOEC y, por tanto, de NOEC, y los efectos de la sustancia problema sobre la tasa de crecimiento, es necesario comparar los promedios de tratamiento utilizando técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se ha de comparar el promedio obtenido a cada concentración con el del control aplicando un método apropiado de comparación múltiple o de prueba de tendencia. Pueden ser útiles las pruebas de Dunnett o Williams (14) (15) (16) (17) (18). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Esta comprobación puede realizarse gráficamente o mediante una prueba en regla (18). Son adecuadas las pruebas de Levene o Bartlett. El incumplimiento de la hipótesis de homogeneidad de las varianzas puede corregirse a veces mediante la transformación logarítmica de los datos. Si la heterogeneidad de la varianza es extrema y no puede corregirse mediante transformación, ha de considerarse la posibilidad de efectuar un análisis por métodos como las pruebas de tendencia de Jonkheere de ajuste secuencial de residuos. En (12) puede encontrarse más información sobre la determinación de la NOEC.

Los recientes avances científicos han llevado a recomendar el abandono del concepto de NOEC para sustituirlo por el de estimaciones puntuales de EC_x basadas en la regresión. Aún no se ha determinado un valor adecuado de x para esta prueba con algas. Parece que es apropiado el intervalo del 10 al 20 % (según la variable de respuesta elegida) y lo mejor es indicar tanto la EC_{10} como la EC_{20}.

2.5. ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO

A veces se observa una estimulación del crecimiento (inhibición negativa) a bajas concentraciones. Esto puede deberse a la hormesis («estimulación tóxica») o a la adición de factores estimulantes del crecimiento al poner el material problema en el medio mínimo utilizado. Téngase en cuenta que la adición de nutrientes inorgánicos no debería tener ningún efecto directo porque el medio de ensayo ha de presentar un exceso de nutrientes a lo largo de todo ensayo. Normalmente, la estimulación a dosis bajas puede ignorarse al calcular la EC_{50}, salvo en casos extremos. Sin embargo, cuando sea extrema o deba calcularse un valor de EC_x para una x baja, puede ser necesario aplicar algún procedimiento especial. Siempre que sea posible debe evitarse la eliminación de las respuestas de estimulación del análisis de datos, y, si los programas informáticos disponibles para el ajuste de las curvas no son capaces de aceptar una estimulación poco importante, puede utilizarse la interpolación lineal con remuestreo (*bootstrapping*). Si la estimulación es extrema, puede considerarse la aplicación de un modelo de hormesis (19).

▼M1

2.6. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR SUSTANCIAS NO TÓXICAS

Los materiales problema que absorben la luz pueden producir una reducción de la tasa de crecimiento porque el sombreado que provocan reduce la cantidad disponible de luz. Tales efectos de tipo físico deben distinguirse de los efectos tóxicos mediante la modificación de las condiciones del ensayo y deben figurar aparte en los informes. Puede encontrarse información al respecto en (2) y (3).

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes, incluido el límite de hidrosolubilidad,

— identificación química, incluida la pureza.

Especie de ensayo:

— cepa, proveedor u origen y condiciones de cultivo aplicadas.

Condiciones de ensayo:

— fecha de inicio y duración del ensayo,

— descripción del diseño del ensayo: recipientes de ensayo, volúmenes de cultivo, densidad de biomasa al inicio del ensayo,

— composición del medio,

— concentraciones de ensayo y réplicas (por ejemplo, número de réplicas en paralelo, número de concentraciones de ensayo y progresión geométrica utilizada),

— descripción de la preparación de soluciones problema, incluido el uso de disolventes, etc.,

— dispositivo de cultivo,

— intensidad y calidad de la luz (fuente, homogeneidad),

— temperatura,

— concentraciones estudiadas: concentraciones nominales de ensayo y eventuales resultados de análisis para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo; deben comunicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de cuantificación de la matriz de ensayo,

— todas las desviaciones respecto al presente método de ensayo,

— método de determinación de la biomasa y pruebas de la correlación entre el parámetro medido y el peso seco.

Resultados:

— valores de pH al inicio y al fin del ensayo en todos los recipientes de tratamiento,

— biomasa de cada matraz en cada punto de medida y método de medición de la biomasa,

▼**M1**

— curvas de crecimiento (biomasa frente al tiempo),

— variables de respuesta calculadas de cada réplica de tratamiento, con valores promedios y coeficiente de variación de las réplicas,

— representación gráfica de la relación concentración-efecto,

— estimaciones de la toxicidad correspondiente a variables de respuesta, por ejemplo, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e intervalos de confianza asociados; en caso de que se calculen la LOEC y la NOEC, se indicarán sus valores y los métodos estadísticos utilizados en su determinación,

— si se ha utilizado el ANOVA, el tamaño del efecto que puede observarse (por ejemplo, la diferencia significativa mínima),

— la eventual estimulación del crecimiento que se haya observado en cualquier recipiente de tratamiento,

— cualquier otro efecto observado como, por ejemplo, cambios morfológicos de las algas,

— discusión de los resultados, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OECD TG 201 (2006). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

(2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23.

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692.

(6) Mayer, P., Cuhel, R., y Nyholm, N. (1997). A simple *in vitro* fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

(7) Slovacey, R.E., y Hanna, P.J. *In vivo* fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp. 919-925.

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., y Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

▼**M1**

(10) Nyholm, N., Sørensen, P.S., Kusk, K.O., y Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(11) Bruce, R.D., y Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King, T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

(15) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(16) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(17) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(18) Draper, N.R., y Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P., y Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

Apéndice 1

Cepas conocidas por ser adecuadas para el ensayo

Algas verdes

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes conocida como *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (antes conocida como *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomeas

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cianobacterias

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Orígenes de las cepas

Las cepas recomendadas pueden conseguirse en forma de cultivos procedentes de una sola célula de alga en las siguientes colecciones (por orden alfabético):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

EE. UU.

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

REINO UNIDO

Sammlung von Algenkulturen

Albrecht-von-Haller-Institut

Universität Göttingen

Nikolausberger Weg 18

37073 Gotinga

ALEMANIA

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

The University of Texas at Austin

Austin, Tejas 78712

EE. UU.

▼M1

Aspecto y características de las especies recomendadas

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspecto	Células curvadas y retorcidas, aisladas	Células ovales, en su mayoría aisladas	Forma cilíndrica	Cadenas de células ovales	Forma cilíndrica
Tamaño (longitud por anchura), en µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volumen celular (μm^3/célula)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Peso seco celular (mg/célula)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Tasa de crecimiento (3) ($día^{-1}$)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Medido con un contador electrónico de partículas.
(2) Calculado a partir del tamaño.
(3) Tasa de crecimiento observada con mayor frecuencia en el medio de la OCDE con una intensidad luminosa aproximada de 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y 21 °C.

Recomendaciones específicas de cultivo y manipulación de las especies de ensayo recomendadas

Pseudokirchneriella subcapitata y *Desmodesmus subspicatus*

Generalmente es fácil mantener estas algas verdes en diversos medios de cultivo. Las colecciones de cultivos proveen información sobre los medios adecuados. Las células están normalmente aisladas, y las mediciones de la densidad celular pueden efectuarse fácilmente con un contador electrónico de partículas o un microscopio.

Anabaena flos-aquae

Pueden utilizarse diversos medios de cultivo para mantener un cultivo de inóculo. Es especialmente importante evitar que el cultivo discontinuo pase de la fase logarítmica de crecimiento al renovarse, ya que la recuperación es difícil después.

Anabaena flos-aquae forma agregados de cadenas encajadas de células. El tamaño de estos agregados puede cambiar según las condiciones de cultivo. Puede ser necesario romper estos agregados si, para determinar la biomasa, se hace un recuento con microscopio o se utiliza un contador electrónico de partículas.

Es posible someter submuestras a un baño de ultrasonidos para romper las cadenas, a fin de reducir la variabilidad del recuento. Si el baño dura más tiempo del necesario para romper las cadenas en segmentos más cortos, puede que se destruyan las células. La intensidad y la duración del baño de ultrasonidos deben ser las mismas con todos los recipientes de tratamiento.

Debe contarse un número suficiente de campos en el hemocitómetro (al menos 400 células) para compensar la variabilidad. Así mejora la fiabilidad de las determinaciones de densidad efectuadas con el microscopio.

Para la determinación del volumen celular total de *Anabaena* puede utilizarse un contador electrónico de partículas tras romper las cadenas de células mediante un baño de ultrasonidos aplicado cuidadosamente. Es necesario ajustar la energía de los ultrasonidos para evitar destruir las células.

Utilícese un mezclador vortex o un método similar adecuado para que la suspensión de algas utilizada para inocular los recipientes de ensayo esté bien mezclada y sea homogénea.

▼**M1**

Los recipientes de ensayo deben colocarse en un agitador orbital o recíproco, a unas 150 revoluciones por minuto. Otra posibilidad es utilizar una agitación intermitente para reducir la tendencia de *Anabaena* a agregarse. Si se produce la agregación, hay que tener cuidado para tomar muestras representativas con el fin de medir la biomasa. Para romper los agregados de algas puede ser necesario agitar vigorosamente antes de tomar la muestra.

Synechococcus leopoliensis

Pueden utilizarse diversos medios de cultivo para mantener un cultivo de inóculo. Las colecciones de cultivos proveen información sobre los medios adecuados.

Synechococcus leopoliensis crece en forma de células aisladas de forma cilíndrica. Las células son muy pequeñas, lo que hace difícil utilizar el recuento con microscopio para medir la biomasa. Son útiles los contadores electrónicos de partículas equipados para contar partículas de hasta un tamaño aproximado de 1 μm. También puede aplicarse la técnica de medición fluorométrica *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Pueden utilizarse diversos medios de cultivo para mantener un cultivo de inóculo. Las colecciones de cultivos proveen información sobre los medios adecuados. Obsérvese el requisito de que el medio tenga silicato.

Navicula pelliculosa puede formar agregados en ciertas condiciones de crecimiento. Debido a la producción de lípidos, las células de las algas tienden a veces a acumularse en la película superficial. En tales circunstancias, hay que adoptar medidas especiales cuando se toman submuestras para la determinación de la biomasa a fin de que las muestras sean representativas. Puede ser necesario agitar enérgicamente, por ejemplo utilizando un mezclador vortex.

▼**M1**

Apéndice 2

Medios de cultivo

Puede utilizarse uno de los dos medios de cultivo siguientes:

Medio de la OCDE: medio original de las directrices de ensayo de la OCDE TG 201, también de acuerdo con la norma ISO 8692.

Medio AAP de la EPA estadounidense, también de acuerdo con la ASTM.

Para preparar estos medios deben utilizarse sustancias de grado analítico o reactivo y agua desionizada.

Composición del medio AAP (EPA estadounidense) y del medio de la OCDE TG 201

Componente	EPA		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) La proporción molar del EDTA respecto al hierro sobrepasa ligeramente la unidad. Así se evita la precipitación del hierro y, a la vez, se reduce al mínimo la quelación de iones de metales pesados.

En el ensayo con la diatomea *Navivcula pelliculosa*, ambos medios deben recibir un suplemento de $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ para obtener una concentración de 1,4 mg Si/l.

El pH del medio se mide en equilibrio entre el carbonato del medio y la presión parcial de CO_2 del aire atmosférico. He aquí la relación aproximada entre el pH a 25 °C y la concentración molar de bicarbonato:

$$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

Con 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (medio de la EPA estadounidense) y con 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (medio de la OECD).

Composición en elementos de los medios de ensayo

Elemento	EPA	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparación del medio de la OCDE

Nutriente	Concentración en la solución madre
Solución madre 1: macronutrientes	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Solución madre 2: hierro	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Solución madre 3: oligoelementos	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Solución madre 4: bicarbonato	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Las soluciones madre se esterilizan mediante filtración por membrana (diámetro medio de poro 0,2 μm) o en autoclave (120 °C, 15 min). Las soluciones se guardan en la oscuridad a 4 °C.

Las soluciones madre 2 y 4 no deben esterilizarse en autoclave, sino mediante filtración por membrana.

▼**M1**

El medio de cultivo se prepara añadiendo a agua un volumen adecuado de las soluciones madre 1 a 4:

A 500 ml de agua destilada se añaden:

— 10 ml de solución madre 1,

— 1 ml de solución madre 2,

— 1 ml de solución madre 3,

— 1 ml de solución madre 4.

Se enrasa a 1 000 ml con agua esterilizada.

Hay que dejar un tiempo suficiente para que el medio llegue al equilibrio con el CO_2 de la atmósfera, en caso necesario burbujeando aire esterilizado por filtración durante varias horas.

Preparación del medio AAP

A1.1. Se añade 1 ml de cada solución madre de A1.2.1-A1.2.7 a unos 900 ml de agua destilada o desionizada y después se diluye hasta 1 litro.

A1.2. Se preparan soluciones madre de macronutrientes disolviendo las siguientes sustancias en 500 ml de agua destilada o desionizada. Los reactivos A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3, y A1.2.4 pueden combinarse en una única solución madre.

A1.2.1. $NaNO_3$ — 12,750 g

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ -6,082 g

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ -2,205 g

A1.2.4. *Solución madre de micronutrientes* (véase A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -7,350 g

A1.2.6. K_2HPO_4 -0,522 g

A1.2.7. $NaHCO_3$ -7,500 g

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ (véase la nota A1.1)

Nota A1.1: Utilícese solo para el ensayo con las especies de diatomeas. Puede añadirse directamente (202,4 mg) o en forma de solución madre para dar una concentración final de 20 mg/l Si en el medio.

A1.3. La solución madre de micronutrientes se prepara disolviendo las siguientes sustancias en 500 ml de agua destilada o desionizada:

A1.3.1. H_3BO_3 — 92,760 mg

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 207,690 mg

A1.3.3. $ZnCl_2$ — 1,635 mg

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 79,880 mg

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,714 mg

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 3,630 mg

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,006 mg

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ — 150,000 mg

[(etilendinitrilo)tetraacetato de disodio]

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,005 mg (véase la nota A1.2)

Nota A1.2: Utilícese solo en el medio para los cultivos madre de especies de diatomeas.

A1.4. Se ajusta el pH a 7,5 ± 0,1 con NaOH o HCl 0,1 **N** o 1,0 **N**.

A1.5. Se pasan los medios a un recipiente estéril filtrando por un filtro de membrana de 0,22 μm si se va a utilizar un contador de partículas o por un filtro de 0,45 μm en caso contrario.

A1.6. Los medios se guardan en la oscuridad a unos 4 °C hasta que se vayan a utilizar.

▼M1

Apéndice 3

Ejemplo de procedimiento de cultivo de algas

Observaciones generales

El objetivo del cultivo mediante el siguiente procedimiento es obtener cultivos de algas para ensayos de toxicidad.

Deben utilizarse métodos apropiados que garanticen que los cultivos de algas no están infectados con bacterias. Puede ser conveniente utilizar cultivos axénicos, pero se deben obtener y utilizar cultivos procedentes de una sola célula de alga.

Todas las operaciones deben llevarse a cabo en condiciones estériles, con el fin de evitar la contaminación con bacterias u otras algas.

Equipo y material

Véase el epígrafe «Equipo» del método de ensayo.

Procedimientos para la obtención de cultivos de algas

Preparación de las soluciones de nutrientes (medios)

Todas las sales nutrientes del medio se preparan como soluciones madre concentradas y se mantienen en lugar fresco y oscuro. Estas soluciones se esterilizan por filtración o en autoclave.

El medio se prepara añadiendo a agua destilada la cantidad correcta de solución madre, teniendo cuidado de que no se produzca ninguna contaminación. Para conseguir un medio sólido se añade un 0,8 % de agar.

Cultivos madre

Los cultivos madre son pequeños cultivos de algas que se trasfieren periódicamente a un medio fresco para hacer de material inicial del ensayo. Si los cultivos no se utilizan regularmente, se extienden en tubos de agar inclinado. De aquí se transfieren a medio fresco al menos cada dos meses.

Los cultivos madre se cultivan en matraces Erlenmeyer que contienen un volumen de unos 100 ml de medio apropiado. Cuando las algas se incuban a 20 °C con iluminación continua, hay que pasar a un nuevo cultivo cada semana.

En este pase se transfiere una cantidad del cultivo «viejo» con pipetas estériles a un matraz de medio fresco, de forma que la concentración inicial en caso de una especie de rápido crecimiento sea unas 100 veces menor que en el cultivo viejo.

La tasa de crecimiento de una especie puede determinarse a partir de la curva de crecimiento. Si se conoce, será posible calcular la densidad a la cual deberá transferirse el cultivo al nuevo medio. Esto deberá realizarse antes de que el cultivo alcance su fase letal.

Precultivo

El objetivo del precultivo es obtener una cantidad apropiada de algas para la inoculación de los cultivos de ensayo. Dicho precultivo debe incubarse en las condiciones del ensayo y utilizarse cuando esté aún en fase de crecimiento exponencial, normalmente después de un período de incubación de 2 a 4 días. Si los cultivos de algas contienen células deformadas o anormales, deberán eliminarse.

▼M1

Apéndice 4

Análisis de datos por regresión no lineal

Consideraciones generales

La respuesta en los ensayos con algas y otros ensayos de crecimiento microbiano (a saber, el incremento de la biomasa) es por su naturaleza una variable continua o métrica: la tasa de un proceso si se utiliza la tasa de crecimiento, o su integral a lo largo del tiempo si se elige la biomasa. Ambas tienen como referencia la respuesta promedio correspondiente de unos controles no expuestos, en réplicas paralelas, que muestran una respuesta máxima en las condiciones aplicadas, siendo la luz y la temperatura los principales factores que influyen en el ensayo de las algas. El sistema es distribuido u homogéneo y la biomasa puede considerarse como un continuo sin tener en cuenta las células en sí. La distribución de la varianza del tipo de respuesta de un sistema de estas características depende solo de los factores experimentales (lo que se describe típicamente con una distribución de errores normal o log-normal). Esto contrasta con las respuestas típicas de bioensayos con datos cuantales, respecto a los cuales se supone con frecuencia que el componente dominante de la varianza es la tolerancia (con una distribución típicamente binomial) de cada uno de los organismos. Las respuestas del control están en este caso a nivel de base o cero.

En la situación sin complicación, la respuesta normalizada o relativa, r, disminuye de forma monótona desde 1 (inhibición nula) hasta 0 (inhibición del 100 %). Obsérvese que todas las respuestas tienen un error asociado, y que es posible calcular inhibiciones negativas aparentes solo como resultado de errores aleatorios.

Análisis de regresión

Modelos

El objeto de un análisis de regresión es describir cuantitativamente la curva concentración-respuesta en forma de una función de regresión matemática $Y = f(C)$ o, más frecuentemente, $F(Z)$, donde $Z = \log C$. De forma inversa $C = f^{-1}(Y)$ permite calcular valores de EC_x, como las EC_{50}, EC_{10} y EC_{20}, y sus límites de confianza del 95 %. Se ha visto que algunas formas funcionales matemáticas simples describen bien las relaciones concentración-respuesta obtenidas en los ensayos de inhibición del crecimiento de las algas. Entre estas funciones figuran, por ejemplo, la ecuación logística, la ecuación asimétrica de Weibull y la función de distribución log-normal, todas las cuales son curvas sigmoideas que se aproximan asintóticamente a uno cuando $C \rightarrow 0$, y a cero cuando $C \rightarrow$ infinito.

Recientemente se ha propuesto el uso de modelos de función de umbral continua (por ejemplo, el modelo de Kooijman «de inhibición del crecimiento de la población», Kooijman *et al*. 1996) como alternativa a los modelos asintóticos. Este modelo supone que no hay efectos a concentraciones por debajo de cierto umbral, EC0+, que se calcula mediante extrapolación de la relación concentración-respuesta hasta su intersección con el eje de las concentraciones utilizando una función continua simple que no es diferenciable en el punto inicial.

Obsérvese que el análisis puede ser una simple minimización de sumas de cuadrados residuales (suponiendo una varianza constante) o cuadrados ponderados si se compensa la heterogeneidad de la varianza.

▼M1

Procedimiento

El procedimiento puede describirse de la manera siguiente: se selecciona una ecuación funcional apropiada, Y = f (C), y se ajusta a los datos mediante regresión no lineal. Es mejor utilizar las mediciones de cada matraz en lugar de los promedios de las réplicas, a fin de obtener de los datos el máximo de información posible. Si la varianza es alta, por otra parte, la experiencia práctica sugiere que los valores promedios de las réplicas pueden dar una estimación matemática más sólida, menos influida por los errores aleatorios de los datos, que si se atiende a los datos de cada uno de los matraces.

Se traza la curva ajustada y los datos medidos, y se examina si es adecuado el ajuste de la curva. El análisis de residuales puede ser una herramienta muy útil a este respecto. Si la relación funcional elegida para ajustar la respuesta a la concentración no describe toda la curva o alguna parte fundamental de ella, como la respuesta a concentraciones bajas, debe elegirse otra opción de ajuste de la curva como, por ejemplo, una curva asimétrica como la función de Weibull, en lugar de una simétrica. Las inhibiciones negativas pueden ser un problema con, por ejemplo, la función de distribución log-normal, y también en este caso ha de aplicarse otra función de regresión. No se recomienda asignar un valor nulo ni uno positivo pequeño a tales valores negativos porque así se distorsiona la distribución del error. Puede ser adecuado hacer ajustes distintos en partes de la curva tales como la de inhibición baja para calcular valores de $EC_{x\cdot bajo}$. A partir de la ecuación ajustada se calculan [por «estimación inversa», $C = f^{-1}(Y)$], unas estimaciones de varias EC_x en puntos característicos y se comunican como mínimo las estimaciones de EC_{50} y una o dos de $EC_{x\cdot bajo}$. La experiencia en la práctica demuestra que la precisión del ensayo de las algas suele permitir una estimación razonablemente exacta del nivel de inhibición del 10 % si hay suficientes puntos de datos, salvo que haya estimulación a bajas concentraciones, lo que sería un factor de confusión. La precisión de una estimación de CE_{20} suele ser bastante mejor que la de una EC_{10}, porque la EC_{20} suele corresponder a la parte aproximadamente lineal del centro de la curva concentración-respuesta. A veces es difícil interpretar la EC_{10} debido a la estimulación del crecimiento. Así pues, aunque la EC_{10} se puede obtener normalmente con suficiente exactitud, se recomienda asimismo indicar la EC_{20}.

Factores de ponderación

La varianza experimental no es constante en general e incluye típicamente un componente proporcional, por lo que es mejor efectuar sistemáticamente una regresión ponderada. Se acepta normalmente que los factores de ponderación de un análisis de este tipo son inversamente proporcionales a la varianza.

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Muchos programas de regresión permiten la opción de hacer un análisis de regresión ponderada con los factores de ponderación incluidos en un cuadro. Es conveniente normalizar los factores de ponderación multiplicándolos por $n/\sum w_i$ (n es el número de puntos de datos) de forma que su suma sea igual a uno.

Respuestas de normalización

La normalización por la respuesta promedio de control plantea varios problemas de principio y ocasiona una estructura de varianza bastante compleja. Al dividir las respuestas por la respuesta promedio del control para obtener el porcentaje de inhibición, se introduce un error más debido al error del promedio del control. Salvo que este error sea despreciable, es necesario corregir los factores de ponderación de la regresión y los límites de confianza para tener en cuenta la covarianza con el control (17). Obsérvese que es importante una elevada precisión del promedio estimado de la respuesta del control a fin de minimizar la varianza general de la respuesta relativa. La varianza se indica a continuación:

▼**M1**

(el subíndice i se refiere al nivel de concentración i y el subíndice 0 a los controles)

$$Y_i = \text{Respuesta relativa} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

con una varianza:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 . \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

y como

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ y } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

con una distribución normal de los datos y las réplicas m_i y m_0

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

la varianza total de la respuesta relativa, Y_i, se convierte entonces en:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

El error en el promedio del control es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de réplicas del control contabilizadas para la media, y a veces se puede justificar la inclusión de datos de antecedentes y, así, reducir mucho el error. Otra posibilidad consiste en no normalizar los datos y ajustar las respuestas absolutas, con inclusión de los datos de la respuesta del control, pero introduciendo el valor de la respuesta del control como parámetro adicional que debe ajustarse con regresión no lineal. Con una ecuación usual de regresión de 2 parámetros, este método necesita el ajuste de 3 parámetros, por lo que exige más puntos de datos que la regresión no lineal de datos que se normalizan mediante una respuesta del control preestablecida.

Intervalos de confianza inversos

El cálculo de intervalos de confianza de regresión no lineal por estimación inversa es bastante complejo y no es una opción frecuentemente disponible en los paquetes normales de programas informáticos de estadística. Pueden obtenerse unos límites de confianza aproximados con programas normales de regresión no lineal con reparametrización (Bruce y Versteeg, 1992), lo que implica reescribir la ecuación matemática con las estimaciones de los puntos deseados, por ejemplo, la EC_{10} y la EC_{50} como parámetros que deben estimarse. [Sea la función $I = f(\alpha, \beta, \text{concentración})$ y utilícense las relaciones de la definición $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ y $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ para sustituir $f(\alpha, \beta, \text{concentración})$ por una función equivalente $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{concentración})$.]

Se realiza un cálculo más directo (Andersen *et al*., 1998) manteniendo la ecuación original y utilizando un desarrollo de Taylor en torno a los promedios de r_i y r_0.

Últimamente se han popularizado los «métodos de remuestreo» (*boot strap*). Tales métodos utilizan los datos medidos y un remuestreo frecuente dirigido por un generador de números aleatorios para calcular una distribución empírica de la varianza.

Bibliografía

Kooijman, S.A.L.M., Hanstveit, A.O., Nyholm, N. (1996). No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D., y Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.

▼B

C.4. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD «FACIL»

PARTE I. CONSIDERACIONES GENERALES

I.1. INTRODUCCIÓN

Se describen seis métodos de ensayo que permiten detectar la biodegradabilidad fácil de los productos químicos en medio acuoso aerobio;

a) pérdida de carbono orgánico disuelto (COD) (Método C.4-A);

b) prueba de detección de la OCDE modificada — Pérdida de COD (Método C.4-B);

c) desprendimiento de dióxido de carbono (CO_2) (prueba de Sturm modificada) (Método C.4-C);

d) respirometría manométrica (Método C.4-D);

e) frasco cerrado (Método C.4-E);

f) MITI (Ministerio de Industria y Comercio Internacional de Japón) (Método C.4-F).

En la Parte I del presente método se recogen consideraciones generales y consideraciones comunes a los seis ensayos. Los aspectos específicos de los distintos métodos se tratan en las partes II a VII. Los anexos contienen definiciones, fórmulas y material complementario.

Un estudio comparativo interlaboratorios, realizado por la OCDE en 1988, demostró la homogeneidad de los resultados obtenidos con estos métodos. Sin embargo, las características físicas de la sustancia problema pueden hacer que se prefiera un método a los otros.

I.2. SELECCIÓN DEL MÉTODO ADECUADO

Para seleccionar el método más adecuado es fundamental poseer información sobre la solubilidad, presión de vapor y características de absorción del producto químico. Debería conocerse la estructura química o la fórmula para calcular los valores teóricos o comprobar los valores obtenidos en las mediciones de parámetros, como DTO, CO_2T, COD, COT o DQO (véanse los anexos I y II).

Las sustancias problema con una hidrosolubilidad no inferior a 100 mg/l pueden estudiarse con cualquier método, siempre que no sean volátiles ni sufran absorción. En el cuadro 1 se indican los métodos adecuados para los productos químicos poco hidrosolubles, volátiles o que sufran absorción. En el anexo III se describe cómo pueden tratarse las sustancias poco hidrosolubles y las volátiles. Las sustancias moderadamente volátiles pueden estudiarse con el método de pérdida de COD si hay bastante espacio para el gas en los recipientes utilizados (que debieran estar convenientemente cerrados). En este caso, es necesario utilizar un control abiótico para tener en cuenta las posibles pérdidas físicas.

▼B

Cuadro 1

Aplicabilidad de los métodos de ensayo

Prueba	Método analítico	Adecuación para sustancias:		
		poco solubles	volátiles	absorbibles
Pérdida de COD	Carbono orgánico disuelto	—	—	+/-
Pérdida OECD modificada	Carbono orgánico disuelto	—	—	+/-
Desprendimiento de CO_2	Respirometría: desprendimiento de CO_2	+	—	+
Respirometría manométrica	Respirometría manométrica: consumo de oxígeno	+	+/-	+
Frasco cerrado	Respirometría: oxígeno disuelto	+/-	+	+
MITI	Respirometría: consumo de oxígeno	+	+/-	+

Es necesario disponer de información sobre la pureza o las proporciones relativas de los principales componentes del producto problema para interpretar los resultados obtenidos, especialmente cuando estos son bajos o dudosos.

El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para bacterias (anexo IV) puede ser muy útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de la biodegradación.

I.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Para comprobar el procedimiento se someten a ensayo sustancias de referencia que cumplan los criterios de biodegradabilidad fácil; para ello se introduce, en paralelo con el ensayo a realizar, una muestra con la sustancia de referencia adecuada.

La anilina (recién destilada), el acetato sódico y el benzoato sódico son sustancias adecuadas. Todas estas sustancias de referencia se degradan con estos métodos aunque no se añada inóculo deliberadamente.

Se pensó en buscar una sustancia de referencia que fuera fácilmente biodegradable pero que necesitara para su biodegradación la adición de inóculo. Se ha propuesto el uso del ftalato ácido de potasio pero es necesario disponer de más información sobre esta sustancia antes de que pueda ser aceptada como sustancia de referencia.

En el ensayo respirométrico, los compuestos que contengan nitrógeno pueden afectar a la captación de oxígeno debido a la nitrificación (véanse los anexos II y V).

I.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO

Se inocula una solución o suspensión de la sustancia problema en un medio mineral y se incuba en condiciones aerobias en la oscuridad o bajo luz difusa. La cantidad de COD en la solución problema debida al inóculo debería mantenerse lo más baja posible respecto a la cantidad de COD debida a la sustancia problema. Para tener en cuenta la actividad endógena del inóculo, se realizan ensayos paralelos en blanco, que contienen inóculo pero sin sustancia problema, si bien la actividad endógena de las células en presencia de la sustancia no corresponderá exactamente con la del control endógeno. Se trabajará en paralelo con una sustancia de referencia para controlar el funcionamiento de los procedimientos.

▼B

En general, la degradación se sigue mediante la determinación de parámetros, como el COD, la producción de CO_2 y el consumo de oxígeno, tomando medidas con la frecuencia suficiente para permitir la identificación del comienzo y de la finalización de la biodegradación. Con los respirómetros automáticos, la medición es continua. El COD se mide a veces junto con otro parámetro, pero esto suele hacerse solo al principio y al final del ensayo. También puede utilizarse el análisis químico específico para evaluar la degradación primaria de la sustancia problema y determinar la concentración de las sustancias intermedias formadas eventualmente (esto es obligatorio en la prueba del MITI).

El ensayo dura normalmente 28 días. Sin embargo, es posible terminar los ensayos antes del día 28, por ejemplo en el caso de que la curva de biodegradación haya alcanzado un nivel constante en, al menos, 3 determinaciones. También es posible prolongar los ensayos mas de 28 días cuando la curva indique que la biodegradación se ha iniciado pero sin que se haya alcanzado el nivel constante el día 28.

I.5. CRITERIOS DE CALIDAD

I.5.1. **Reproducibilidad**

Debido a la naturaleza de la biodegradación y de las poblaciones bacterianas mixtas utilizadas como inóculos, las determinaciones deben realizarse al menos por duplicado.

La experiencia indica que la variación entre duplicados será menor cuanto mayor sea la concentración de microorganismos añadida inicialmente al medio de ensayo. También se ha visto en estudios interlaboratorios que pueden darse grandes variaciones entre los resultados obtenidos por diferentes laboratorios; no obstante, con los compuestos químicos que son fácilmente biodegradables se obtienen normalmente resultados concordantes.

I.5.2. **Validez del ensayo**

Un ensayo se considera válido si la máxima diferencia entre los duplicados respecto a los valores de la eliminación de la sustancia problema en la parte de la gráfica en forma de meseta, al final del test o al final del período de diez días, es inferior al 20 % y si la degradación porcentual de la sustancia de referencia alcanza el nivel de biodegradabilidad fácil antes de los 14 días. Si no se cumple alguna de estas condiciones, es necesario repetir el ensayo. Debido al rigor de los métodos, la obtención de bajos porcentajes de biodegradación no significa necesariamente que la sustancia problema no sea biodegradable en condiciones ambientales, sino que indica que será necesario realizar más estudios para establecer la biodegradabilidad.

Si en un ensayo de toxicidad, realizado con la sustancia problema junto con una sustancia de referencia, se obtiene en 14 días menos del 35 % de degradación (según el COD) o menos del 25 % (según la DTO o el CO_2T), se supone que la sustancia de ensayo es inhibidora (véase también el anexo IV). La serie de ensayo debe repetirse, a ser posible, utilizando una concentración inferior de sustancia problema o una concentración superior de inóculo, que no exceda de 30 mg de sólidos/litro.

I.6. PREPARATIVOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

En el cuadro 2 se resumen las condiciones generales aplicables a los ensayos. El material y las demás condiciones experimentales relativas específicamente a un ensayo concreto se describen después bajo el título de cada ensayo.

▼B

Cuadro 2

Condiciones de los ensayos

Ensayo	Perdida de DOC	Desprendimiento de CO_2	Respiración manométrica	Detección de la OCDE modificada	Frasco cerrado	MITI-(I)
Concentración de sustancia problema						
mg/l			100		2-10	100
mg COD/l	10-40	10-20		10-40		
mg DTO/l			50-100		5-10	
Concentración de inóculo (en células/l, aproximadamente)	≤ 30 mg/l SS o ≤ 100 ml efluente/l (10^7-10^8)			0,5 ml efluente secundario/l (10^5)	≤ 5 ml efluente/l (10^4-10^6)	30mg/l SS (10^7-10^8)
Concentración de elementos en el medio mineral (en mg/1):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferentemente 7,0
Temperatura	22 ± 2 ºC					25 ± 1 ºC

COD = Carbono orgánico disuelto DTO = Demanda teórica de oxígeno SS = Sólidos en suspensión

I.6.1. **Agua de dilución**

Se usará agua desionizada o destilada, exenta de sustancias tóxicas (por ejemplo, iones Cu^{++}) a concentraciones inhibidoras. No debe contener más del 10 % del contenido en carbono orgánico introducido por la sustancia problema. Esta elevada pureza del agua es necesaria para no obtener valores elevados en la prueba en blanco. La contaminación puede proceder de impurezas inherentes, y también, de las resinas cambiadoras de iones y de residuos materiales procedentes de bacterias y algas. Para cada serie de ensayos debe utilizarse un solo lote de agua, comprobado previamente mediante análisis de COD. Esta comprobación no es necesaria para el ensayo del frasco cerrado, pero el consumo de oxígeno del agua debe ser bajo.

▼B

I.6.2. **Soluciones madre de elementos minerales**

Las soluciones de ensayo se prepararán a partir de soluciones madre de elementos minerales en concentración adecuada. Las siguientes soluciones madre pueden utilizarse (con diferentes factores de dilución) en los métodos de pérdida de COD, detección de la OCDE modificada, desprendimiento de CO_2, respirometria manométrica y frasco cerrado.

Los factores de dilución y, en el caso de la prueba MITI, la preparación específica del medio mineral se recogen bajo el encabezamiento de cada prueba específica.

Soluciones madre:

Hay que preparar las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de grado analítico.

a)	Ortofosfato diácido de potasio, KH_2PO_4	8,50 g
	Ortofosfato ácido de potasio, K_2HPO_4	21,75 g
	Ortofosfato ácido de, sodio dihidratado $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40 g
	Cloruro amónico, NH_4CL	0,50 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro. El pH de la solución debe ser 7,4	
b)	Cloruro calcico, anhidro, $CaCl_2$ o	27,50 g
	Cloruro cálcico dihidratado, $CaCl_2 - 2 H_2O$	36,40 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro	
c)	Sulfato magnésico heptahidratado, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro	
d)	Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3 . 6 H_2O$	0,25 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro	

Nota: Con el fin de no tener que preparar esta solución inmediatamente antes de su uso, añádase una gota de HC1 concentrado o 0,4 g de EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético) por litro.

I.6.3. **Soluciones madre de productos químicos**

Por ejemplo, disolver de 1 a 10 g, según se considere adecuado, de sustancia problema o de referencia en agua desionizada y enrasar a 1 litro cuando la solubilidad sea superior a 1 g/l. En caso contrario, preparar soluciones madre en el medio mineral o añadir los productos químicos directamente en el medio mineral. Para el tratamiento de productos químicos menos solubles, véase el anexo III, pero teniendo en cuenta que en la prueba del MITI (Método C.4-F) no pueden utilizarse ni disolventes ni emulgentes.

▼B

I.6.4. **Inóculos**

El inóculo puede proceder de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes (no cloradas), aguas superficiales, suelos o una mezcla de todo ello. En el caso de los ensayos de pérdida de COD, desprendimiento del CO_2 y respirometría manométrica, si se utiliza lodo activado, este debe proceder de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Se ha visto que los inóculos procedentes de otras fuentes dan resultados más dispersos. En el caso de la prueba de detección de la OCDE modificada y de la prueba de frasco cerrado, es necesario un inóculo más diluido sin flóculos de lodo y la fuente preferida es un efluente secundario procedente de una depuradora de aguas residuales domésticas o de una instalación de laboratorio. En el caso del método MITI, el inóculo se obtiene mezclando material procedente de distintas fuentes y se describe bajo el encabezamiento específico de esta prueba.

I.6.4.1. *Inóculo procedente de lodos activados*

Se recoge una muestra de lodo activado recién obtenido del depósito de aireación de una planta depuradora de aguas residuales o de una instalación de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas. En caso necesario, se retiran las partículas gruesas, por filtración a través de un tamiz fino y a continuación se mantiene el lodo en condiciones aerobias.

Otra posibilidad es dejar sedimentar o centrifugar (por ejemplo, a 1 100 g durante 10 minutos) después de eliminar las posibles partículas gruesas. Se desecha el sobrenadante. El lodo puede ser lavado en el medio mineral. Se suspende el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/1 y se somete a aireación hasta que se utilice.

El lodo debería obtenerse de una planta convencional que trabaje adecuadamente. Si tiene que obtenerse el lodo de una planta depuradora de elevado rendimiento o cuando se píense que contiene inhibidores, debería lavarse el lodo. El lodo resuspendido se mezcla bien y se deja sedimentar o se centrifuga, se desecha el sobrenadante del lodo lavado y se vuelve a resuspender en otro volumen de medio mineral. Este procedimiento se repite hasta que se considere que el lodo queda exento de un exceso de sustrato o de inhibidores.

Después de conseguir la resuspensión completa, o con el lodo sin tratar, se toma una muestra justo antes de su utilización para determinar el peso seco de los sólidos en suspensión.

Otra posibilidad diferente es homogeneizar el lodo activado (de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/1). Se trata el lodo en un agitador mecánico durante 2 minutos a velocidad media. El lodo agitado se deja sedimentar durante 30 minutos, o más en caso necesario, y se decanta el líquido para utilizarlo como inóculo en la proporción de 10 ml/l de medio mineral.

I.6.4.2. *Otras fuentes de inóculos*

Este inóculo puede obtenerse a partir del efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Se toma una muestra reciente y se mantiene en condiciones aerobias durante el transporte. Se deja sedimentar durante 1 hora o se filtra a través de papel de filtro grueso y el efluente decantado o el filtrado se mantiene en condiciones aerobias hasta su utilización. Pueden utilizarse hasta 100 ml de este tipo de inóculo por cada litro de medio.

▼B

Otra fuente adicional de inóculo es el agua superficial. En este caso, se recoge una muestra de un agua superficial adecuada como, por ejemplo, ríos o lagos, y se mantiene en condiciones aerobias hasta su utilización. En caso necesario, se concentra el inóculo por filtración o centrifugación.

I.6.5. **Acondicionamiento previo de los inóculos**

Los inóculos pueden estar preacondicionados a las condiciones experimentales, pero no preadaptados a la sustancia problema. El acondicionamiento previo consiste en la aireación del lodo activado en medio mineral o bien del efluente secundario durante 5 o 7 días a la temperarura del ensayo. El acondicionamiento previo mejora a veces la precisión de los métodos de ensayo reduciendo los valores del blanco. El acondicionamiento previo se considera innecesario para el inóculo del MITI.

I.6.6. **Controles abióticos**

Cuando sea necesario, se estudiará la posible degradación abiótica de la sustancia problema determinando la eliminación de COD, el consumo de oxígeno o el desprendimiento de dióxido de carbono en controles estériles que no contengan inóculo. La esterilización se consigue mediante filtración a través de membrana (0,2-0,45 micrómetros) o mediante la adición de una sustancia tóxica adecuada a la concentración conveniente. Si se utiliza una membrana de filtración, coger las muestras de forma aséptica para mantener la esterilidad. A no ser que la absorción de la sustancia problema haya sido excluida de antemano, las pruebas en las que se mide la biodegradación como la eliminación de COD, especialmente con lodo activado como inóculo, debieran incluir un control abiótico inoculado v envenenado.

I.6.7. **Número de frascos**

El número de frascos en un ensayo normal se describe bajo el encabezamiento de cada ensayo.

Pueden utilizarse los siguientes tipos de frasco:

— Suspensión de ensayo: conteniendo la sustancia problema y el inóculo.

— Inóculo aislado: conteniendo únicamente inóculo.

— Control del procedimiento: conteniendo sustancia problema e inóculo.

— Control estéril abiótico: estéril, conteniendo la sustancia problema (véase el punto I.6.6).

— Control de absorción: conteniendo la sustancia problema, inóculo y agente esterilizante.

— Control de toxicidad: conteniendo la sustancia problema, la sustancia de referencia e inóculo.

La determinación en la suspensión de ensayo y la determinación en el inóculo aislado deberían realizarse obligatoriamente en paralelo. Es aconsejable realizar las determinaciones en los otros frascos también en paralelo.

Sin embargo, esto puede no ser siempre posible. Hay que asegurarse de que se toman bastantes muestras o lecturas para tener la certeza de que se alcanza el porcentaje de eliminación adecuado durante el período de tiempo de 10 días.

▼B

I.7 DATOS Y EVALUACIÓN

Para el cálculo de D_t, degradación porcentual, se utilizan los valores medios de las medidas de los parámetros, realizadas por duplicado en los dos recipientes del ensayo y en el blanco. Las fórmulas vienen dadas en las secciones específicas correspondientes a cada ensayo. El curso de la degradación se representa gráficamente y se indica el período de observación de 10 días. Se calcula y se registra la pérdida porcentual al final del período de observación de 10 días y el valor en la fase estacionaria o al final del ensayo, según se considere adecuado.

En los ensayos respirométricos, los compuestos nitrogenados pueden afectar al consumo de oxígeno debido a la nitrificación (véanse los anexos II y V).

I.7.1. **Medida de la degradación basada en la determinación del COD**

El porcentaje de degradación (D_t) en cada momento en que se tome una muestra debiera calcularse separadamente para los frascos conteniendo la sustancia problema, utilizando los valores medios de las medidas por duplicado del COD con el fin de valorar la validez de la prueba (véase el punto 1.5.2). Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

donde:

D_t = degradación porcentual en el tiempo t.

C_o = concentración media inicial de COD en el medio de cultivo inoculado con la sustancia problema (mg COD/l),

C_t = concentración media de COD en el medio de cultivo inoculado con sustancia problema en el tiempo t (mg COD/l),

C_{bo} = concentración media inicial de COD en el medio mineral en blanco inoculado (mg COD/l),

C_{bt} = concentración media de COD en el medio mineral en blanco inoculado, en el tiempo t (mg COD/l).

Todas las concentraciones son las obtenidas experimentalmente.

I.7.2. **Degradación medida por análisis específicos**

Cuando se tienen datos analíticos específicos, la biodegradación primaria se calcula con la fórmula siguiente:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

donde:

D_t = degradación porcentual en el tiempo t, normalmente 28 días

S_a = cantidad residual de sustancia problema en el medio inoculado al final de la prueba (mg)

S_b = cantidad residual de sustancia problema en la prueba en blanco con agua o medio a los que solo se ha añadido la sustancia problema (mg).

▼B

I.7.3. **Degradación abiótica**

Cuando se utilice un control abiótico estéril, calcular el porcentaje de degradación abiótica utilizando:

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Donde:

$C_{s(o)}$ = concentración COD en el control estéril el día 0,

$C_{s(t)}$ = concentración COD en el control estéril el día t.

I.8. INFORME

El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— sustancias problema y de referencia así como su pureza,

— condiciones del ensayo,

— inóculo: naturaleza y lugar o lugares de recogida, concentración y posible tratamiento de acondicionamiento previo,

— proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se conocen,

— tiempo de duración del ensayo y temperatura a la que se ha realizado,

— en caso de sustancias problema poco solubles, tratamiento realizado,

— método de ensayo utilizado; motivos científicos y explicación en caso de que se haya realizado algún cambio en el procedimiento,

— ficha de recogida de datos,

— cualquier fenómeno de inhibición que se haya observado,

— cualquier degradación abiótica que se haya observado,

— datos químicos analíticos específicos, si se tienen,

— datos analíticos sobre los intermediarios, si se tienen,

— gráfica de la degradación porcentual frente al tiempo para las sustancias problema y de referencia; hay que indicar claramente la fase de latencia, la fase de degradación, el período de observación de 10 días y la pendiente (anexo I). Si la prueba ha cumplido con los criterios de validez, podrá utilizarse para la gráfica la media de los porcentajes de degradación de los frascos que contengan la sustancia problema,

— porcentaje de eliminación obtenido después del período de observación de 10 días, en la fase estacionaria y al final de la prueba.

PARTE II. **ENSAYO BASADO EN LA PÉRDIDA DE COD** (Método C.4-A)

II.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Un volumen medido de medio mineral inoculado con una concentración conocida de la sustancia problema (10-40 mg COD/l) como única fuente nominal de carbono orgánico se somete a aireación en la oscuridad o bajo luz difusa a 22 ± 2 ºC.

▼B

La degradación se va siguiendo mediante el análisis del COD a intervalos frecuentes durante un período de 28 días. El grado de biodegradación se calcula expresando la concentración de COD eliminada (corregida con los valores obtenidos en el blanco con inóculo) como porcentaje de la concentración presente inicialmente. El grado de biodegradación primaria también puede calcularse mediante análisis químico complementario realizado al principio y al final de la incubación.

II.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

II.2.1. **Equipo**

a) Matraces cónicos, por ejemplo de 250 ml hasta 2 l, según el volumen necesario para los análisis de COD.

b) Agitador para matraces cónicos, bien con control automático de la temperatura o bien situado en una sala a temperatura constante. La agitación debe ser suficiente como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces.

c) Equipo de filtración con membranas adecuadas.

d) Analizador de COD.

e) Equipo para determinar el oxígeno disuelto.

f) Centrífuga.

II.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de solución (a) con 800 ml de agua de dilución, se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 1 con agua de dilución.

II.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4, I.6.4.I, I.6.4.2 y I.6.5.

II.2.4. **Preparación de los matraces**

Como ejemplo, se introducen alícuotas de 800 ml de medio mineral en matraces cónicos de 2 litros y se añaden volúmenes suficientes de las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia a los distintos matraces para obtener una concentración de sustancia equivalente a 10-40 mg COD/l. Controlar los valores del pH y ajustar a 7,4 si es necesario. Se inoculan los matraces con lodo activado u otra fuente de inóculo (véase el punto I.6.4), para obtener una concentración final que no exceda de 30 mg de sólidos en suspensión/1. También hay que preparar controles del inóculo en el medio mineral pero sin sustancia problema ni de referencia.

En caso necesario, puede utilizarse un recipiente para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema inoculando una solución que contenga, en el medio mineral, concentraciones comparables tanto de la sustancia problema como de la sustancia de referencia.

También, en caso necesario, puede prepararse otro matraz estéril para observar si la sustancia problema se degrada abióticamente. Para ello, se utiliza una solución de la sustancia problema sin inoculo (véase el punto 1.6.6).

▼B

Además, si se sospecha que la sustancia problema puede adsorberse de forma significativa en las paredes o fondo del recipiente utilizado para la realización del ensayo, en los lodos, etc., hay que hacer una evaluación previa para determinar la importancia de la adsorción y, en consecuencia, la idoneidad de la prueba para esa sustancia (véase el cuadro 1). Preparar un matraz conteniendo la sustancia problema, el inoculo y el agente esterilizante.

Todos los matraces se enrasan a 1 l con medio mineral y, tras mezclar, se toma una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD (véase el anexo II.4). Por ejemplo, se tapa la boca de los matraces con papel de aluminio, de forma que se permita la libre circulación de aire entre el matraz y la atmósfera ambiente. A continuación se ponen los recipientes en el agitador para iniciar el ensayo.

II.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril abiótico

Matraz 7: control de adsorción

Matraz 8: control de toxicidad.

Véase también el punto 1.6.7.

II.2.6. **Realización del ensayo**

A lo largo de todo el ensayo, hay que determinar la concentración de COD en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos con la suficiente frecuencia para poder determinar el principio del período de observación de 10 días y la pérdida porcentual al final de dicho período de 10 días. Debe limitarse al mínimo el volumen de suspensión problema tomado para cada determinación.

Antes de tomar las muestras, hay que compensar las pérdidas por evaporación de los matraces añadiendo agua de dilución (véase el anexo I.6.1) en la cantidad necesaria. Antes de tomar las muestras hay que homogeneizar bien el medio de cultivo y asegurarse de que el material que se adhiere a las paredes de los recipientes se disuelve o resuspende. Inmediatamente después de tomar la muestra, esta se filtra por membrana o se centrifuga (véase el anexo II.4). La muestra filtrada o centrifugada se analiza el mismo día; en caso contrario, se conserva a 2-4 ºC durante un máximo de 48 horas, o por debajo de -18 ºC durante un período mayor.

II.3. DATOS E INFORME

II.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Calcular la degradación porcentual al tiempo t según se indica en el punto I.7.1. (determinación de COD) y, de forma optativa, en el punto I.7.2 (análisis específico).

Todos los resultados deben registrarse en las fichas de recogida de datos presentadas.

▼B

II.3.2. **Validez de los resultados.**

Véase el punto I.5.2.

II.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

II.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de la ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE PÉRDIDA DE COD

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:…

Concentración de la solución madre: … mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio, t_o: … mg/l en sustancia química

4. **INÓCULO**

Fuente:…

Tratamiento realizado:

Acondicionamiento previo en su caso:…

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de ensayo: … mg/l

5. **DETERMINACIONES DE CARBONO**

Analizador de carbono:

	Matraz nº		COD tras n días (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substancia problema más inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_2					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					

▼B

	Matraz nº		COD tras n días (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ensayo en blanco con inóculo pero sin substancia problema	3	c_2					
		c_2					
		c, media $C_{b(t)}$					
	4	d_2					
		d_2					
		d, media $C_{b(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

Matraz nº		% de degradación tras n días				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Si existe una diferencia considerable entre D_1 y D_2, no debe calcularse el término medio.

Nota: Pueden utilizarse fórmulas similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. **CONTROL ABIóTICO** (optativo)

	Tiempo (días)	
	0	t
conc. de COD (mg/l) en el control estéril	$C_{s(o)}$	

$$\% \text{ de degradación abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO** (optativo)

	Cantidad residual de la substancia química al final de la prueba (mg/l)	% degradacíon
Control estéril	S_b	

▼B

	Cantidad residual de la substancia química al final de la prueba (mg/l)	% degradacíon
Prueba con el media inoculado	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE III. **ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OCDE MODIFICADO** (Método C.4-B)

III. 1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Un volumen medido de medio mineral con una concentración conocida de la sustancia problema (10-40 mg COD/l) como única fuente nominal de carbono orgánico se inocula con 0,5 ml de efluente por litro de medio. La mezcla se airea en la oscuridad o bajo luz difusa a 22 ± 2 ºC.

La degradación se va siguiendo mediante análisis del COD a intervalos frecuentes a lo largo de un período de 28 días. El grado de biodegradación se calcula expresando la concentración de COD eliminado (corregida con los valores obtenidos en el blanco con inoculo) como porcentaje de la concentración presente inicialmente. El grado de biodegradación primaria también puede calcularse a partir de análisis químicos suplementarios realizados al principio y al final de la incubación.

III.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

III.2.1. Equipo

a) Matraces cónicos, por ejemplo de 250 ml a 2 l, según el volumen necesario para el análisis de COD.

b) Agitador para matraces cónicos, bien con control automático de temperatura o bien situado en una sala de temperatura constante. La agitación debe ser suficiente como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces.

c) Equipo de filtración con membranas adecuadas.

d) Analizador de COD.

e) Equipo para determinar el oxígeno disuelto.

f) Centrífuga.

III.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de la solución (a) con 800 ml de agua de dilución, se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 1 con agua de dilución.

Este método utiliza tan solo 0,5 ml de efluente/l como inoculo y, por tanto, puede ser necesario enriquecer el medio con oligoelementos y factores de crecimiento. Esto se consigue añadiendo 1 ml de cada una de las siguientes soluciones por litro de medio final:

▼B

Solución de oligoelementos:

Sulfato de manganeso tetrahidratado, $MnSO_4 . 4H_2$	39,9 mg
Acido bórico, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfato de zinc heptahidratado, $ZnSO_4 . 7H_2$	42,8 mg
Heptamolibdato de amonio $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Quelato de hierro ($FeCl_3$ ácido etilendiamínotetraacético)	100,0 mg

Disolver en agua de dilución y llevar a 1 000 ml.

Solución de vitaminas:

Extracto de levadura	15,0 mg

Disolver el extracto de levadura en 100 ml de agua. Esterilizar mediante filtración por membrana de 0,2 micrómetros o bien preparar extemporáneamente.

III.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo está derivado de un efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba de manera primordial aguas residuales domésticas. Véanse los puntos I.6.4.2. y I.6.5.

Se usan 0,5 ml por litro de medio mineral.

III.2.4. **Preparación de los matraces**

Se introducen porciones de, por ejemplo, 800 ml de medio minera] en matraces cónicos de 2 litros y se añaden volúmenes suficientes de las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia a los distintos matraces para obtener una concentración de sustancia equivalente a 10-40 rng COD/l. Revise el valor pH y ajústelo si es necesario, a 7,4. Se inoculan los matraces con efluente de aguas residuales en la proporción de 0,5 ml/l (véase el punto I.6.4.2). También deben prepararse controles del inóculo con el medio mineral pero sin sustancia problema ni de referencia.

En caso necesario, puede utilizarse un matraz para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema inoculando una solución que contenga, en medio mineral, concentraciones comparables tanto de la sustancia problema como de una sustancia de referencia.

También, en caso necesario, puede prepararse otro matraz estéril para comprobar si la sustancia problema se degrada abioticamente utilizando una solución de esta sustancia sin inóculo (véase el punto I.6.6).

Además, si se sospecha que la sustancia problema puede adsorberse de forma significativa en el recipiente utilizado para el ensayo, en los lodos, etc., debe hacerse una prueba previa para determinar el alcance probable de la absorción y, en consecuencia, la adecuación de la prueba para esa sustancia concreta (véase el cuadro 1). Prepárese un matraz conteniendo la sustancia problema, el inóculo y un agente esterilizante.

Todos los matraces se enrasan a 1 1 con medio mineral y, después de agitar, se toma una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD (véase el anexo II.4). Se tapan las bocas de los matraces con papel de aluminio, por ejemplo, de forma que se permita la libre circulación de aire entre el matraz y la atmósfera circundante. A continuación se ponen los recipientes en el agitador para iniciar el ensayo.

▼B

III.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inoculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril abiótico

Matraz 7: control de adsorción

Matraz 8: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

III.2.6. **Realización del ensayo**

A lo largo del ensayo hay que determinar las concentraciones de COD en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos, con la suficiente frecuencia como para poder determinar el inicio del período de observación de 10 días y el porcentaje de eliminación al final de dicho período de 10 días. Para cada determinación debe tomarse solo el volumen mínimo necesario de suspensión problema.

Antes de tomar las muestras, hay que compensar las pérdidas que se han producido por evaporación del medio de ensayo en los matraces, añadiendo la cantidad necesaria de agua de dilución (I.6.1). Antes de tomar las muestras hay que agitar bien el medio de cultivo y asegurarse de que el material que se hubiera adherido a las paredes de los recipientes se disuelve o se resuspende. Se filtra por membrana o se centrifuga (véase el anexo II.4) inmediatamente después de haber tomado la muestra. Las muestras filtradas o centrifugadas se analizan el mismo día; en caso contrario, se conservan a 2-4 ºC durante 48 horas como máximo o por debajo de - 18 ºC durante un período más prolongado

III.3. DATOS E INFORME

III.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se calcula el porcentaje de degradación en el tiempo t según se indica en I.7.1 (determinación de COD) y, de forma optativa, en I.7.2 (análisis específico).

Todos los resultados deben registrarse en las fichas de recogida de datos indicadas.

III.3.2. Validez de los resultados

Véase el punto I.5.2.

III.3.3. Informe

Véase el punto I.8.

III.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se ofrece un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OECD MODIFICADO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

▼B

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:

Concentración de la solución madre: … mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio, t_0: … mg/l en sustancia química

4. **INÓCULO**

Fuente:

Tratamiento realizado:

Acondicionamiento previo en su caso:

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: mg/l

5. **DETERMINACIONES DE CARBONO**

Analizador de carbono:

	Matraz nº		COD tras n días (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substancia problema más inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_2					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Blanco con inóculo pero sin substancia problema	3	c_2					
		c_2					
		c, media $C_{b(t)}$					
	4	d_2					
		d_2					
		d, media $C_{b(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

Matraz		% de degradación trasndías				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Matraz		% de degradación trasndías				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Si existe una diferencia considerable entre D_1 y D_2, no debe calcularse el término medio.

Nota: Pueden utilizarse fórmulas similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. **CONTROL ABIÓTICO** (optativo)

	Tiempo (dias)	
	0	t
conc. de COD (mg/l) en el control estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de degradación abiótica } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALISIS QUÍMICO ESPECÍFICO** (optativo)

	Cantidad residual de la substancia química al final de la prueba	% degradacíib primaria
Control estéril	S_b	
Prueba con el medio inoculado	S^a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE IV. ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE CO_2 (Método C.4-C)

IV.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se hace pasar una corriente de aire exento de dióxido de carbono a velocidad controlada, en la oscuridad o bajo luz difusa, a través de un volumen medido de medio mineral inoculado que contiene una concentración conocida de la sustancia problema (10-20 mg COD o COT/l) como única fuente nominal de carbono orgánico. La degradación se observa a lo largo de 28 días determinando el dióxido de carbono producido, que se recoge en hidróxido de sodio o de bario y se mide por valoración del hidróxido residual o como carbono inorgánico. La cantidad de dióxido de carbono producido a partir de la sustancia problema (con las correcciones necesarias según el resultado del blanco con inóculo) se expresa como porcentaje de CO_2T. El grado de biodegradación también puede calcularse mediante un análisis complementario de COD realizado al principio y al final de la incubación.

▼B

IV.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

IV.2.1. **Equipo**

a) Matraces, 2-5 litros, provisto cada uno de un tubo de aireación, que llegue practicamente al fondo del recipiente, y de una salida.

b) Agitadores magnéticos, cuando se trate de sustancias poco solubles.

c) Frascos de absorción de gases.

d) Aparato para controlar y medir el flujo de aire.

e) Aparato para eliminar el dióxido de carbono en la preparación de aire exento de dióxido de carbono; otra posibilidad es utilizar una mezcla de oxigeno exento de CO_2 y de nitrógeno exento de CO_2, provenientes de sendas botellas, en las proporciones correctas (20 % O_2:80 % N_2).

f) Equipo para determinar el dióxido de carbono, bien volumétricamente o bien con un analizador de carbono inorgánico.

g) Equipo de filtración por membrana (opcional).

h) Analizador de COD (opcional).

IV.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de las soluciones madre, véase el puanto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de solución (a) con 800 ml de agua de dilución; se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 1 con agua de dilución.

IV.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 y I.6.5.

IV.2.4. **Preparación de los matraces**

Los siguientes volúmenes y pesos, dados meramente como ejemplo, indican los valores apropiados para matraces de 5 litros que contengan 3 1 de suspensión. Si se utilizan volúmenes más pequeños hay que modificar los valores en consecuencia, pero hay que asegurarse de que el dióxido de carbono formado puede medirse con precisión.

A cada matraz de 5 litros se añaden 2 400 ml de medio mineral. Se añade a continuación un volumen adecuado del lodo activado ya preparado (véanse los puntos I.6.4.1 y I.6.5) para tener una concentración de sólidos en suspensión que no exceda de 30 mg/l en el volumen final de 3 l de mezcla inoculada. Otra posibilidad es diluir en primer lugar el lodo preparado para obtener una suspensión de 500-1 000 mg/1 en el medio mineral antes de añadir una alícuota al contenido del matraz de 5 litros para obtener una concentración final de 30 mg/l; de esta forma se consigue mayor precisión. También pueden utilizarse otras fuentes de inóculos (véase el punto I.6.4.2). Añadir una alícuota al contenido del matraz de 5 litros para obtener una concentración final de 30 mg/l; de esta forma se consigue mayor precisión. También pueden utilizarse otras fuentes de inóculos (véase el punto I.6.4.2).

Estas mezclas inoculadas se someten a un flujo de aire exento de CO_2 durante una noche para purgar el dióxido de carbono del sistema.

▼B

Se añade a los matraces, por separado y por duplicado, la sustancia problema y la sustancia de referencia procedentes de sendas soluciones madre, en volúmenes conocidos, como para obtener concentraciones de 10 a 20 mg de COD o COT/l, procedente de las sustancias añadidas; algunos matraces se dejan como controles del inóculo sin añadirles ninguna sustancia. Las sustancias problema poco solubles se añaden directamente, a los matraces teniendo en cuenta una relación de peso o de volumen, o bien se opera según se describe en el anexo III.

En caso necesario, puede utilizarse un matraz para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema añadiendo tanto sustancia problema como sustancia de referencia en las mismas concentraciones que se dan en los otros matraces.

También, en caso necesario, puede utilizarse un matraz estéril para comprobar si la sustancia problema se degrada abioticamente utilizando una solución de la sustancia sin inóculo (véase I.6.6.). Esterilícese mediante la adición de una sustancia tóxica en la concentración apropiada.

Se llevan los volúmenes de las suspensiones de todos los matraces a 3 l mediante adición de medio mineral previamente aireado con aire exento de CO_2. Otra posibilidad es tomar muestras para el análisis del COD (véase el anexo II.4.) o análisis específicos. Se conectan los frascos de absorción a las salidas de aire de los matraces.

Si se utiliza hidróxido de bario, hay que conectar a cada matraz de 5 litros tres frascos de absorción puestos en serie, cada uno con 100 ml de solución de hidróxido de bario 0,0125 M. La solución debe estar exenta de sulfatos y carbonatos precipitados y su concentración debe determinarse justo antes de ser utilizada. Si se utiliza hidróxido de sodio, se conectan dos frascos, de los que el segundo actúa como control para comprobar que todo el dióxido de carbono ha quedado absorbido en el primero. Son adecuados los frascos de absorción provistos de cierres de botellas de suero. A cada frasco se añaden 200 ml de solución de hidróxido de sodio 0,05 M, cantidad suficiente para absorber todo el dióxido de carbono producido si la sustancia química se degrada por completo. La solución de hidróxido de sodio, incluso cuando se prepara extemporáneamente, contiene trazas de carbonatos; esto se corrige deduciendo la cantidad de carbonatos presentes en el blanco.

IV.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril abiótico

Matraz 7: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

IV.2.6. **Realización del ensayo**

El ensayo se inicia haciendo borbotear aire exento de CO_2 a través de las suspensiones a la velocidad de 30-100 ml/min. Periódicamente se toman muestras del absorbente de dióxido de carbono para analizar el contenido de CO_2. Durante los primeros 10 días se recomienda que los análisis se hagan cada dos o tres días y, después, cada cinco días hasta llegar al día 28, de forma que pueda determinarse el período de observación de 10 días.

▼B

El día 28 se toman muestras (opcionalmente) para el análisis de COD o análisis específicos, se mide el pH de las suspensiones y se añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado a cada matraz; se airean los frascos durante una noche para arrastrar el dióxido de carbono presente en las suspensiones problema. El día 29 se hace el último análisis del dióxido de carbono producido.

Los días en que se haga la medición del CO_2, se desconecta el absorbente de hidróxido de bario más próximo al matraz y se valora la solución de hidróxido con HC1 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. Los restantes absorbentes se unen al matraz y se coloca en el extremo libre de la serie un nuevo absorbente con 100 ml de hidróxido de bario 0,0125 M recién preparado. Hay que hacer valoraciones según sea necesario, por ejemplo, cuando se observe la aparición de un precipitado importante en el primer frasco y antes de que aparezca en el segundo, o al menos una vez por semana. Cuando se utiliza NaOH como absorbente, se toma con jeringa una muestra pequeña (según las características del analizador de carbono utilizado) de la solución de hidróxido de sodio del absorbente más próximo al matraz. Se inyecta la muestra en la parte CI del analizador de carbono para analizar directamente el dióxido de carbono producido.

El contenido del segundo frasco solo se analiza al final de la prueba para introducir las correcciones necesarias en caso de que se haya producido arrastre de dióxido de carbono.

IV.3. DATOS E INFORME

IV.3.1. **Tratamiento de los resultados**

La cantidad de CO_2 retenida en un absorbente viene dada por:

$$mgCO2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

donde:

V = volumen de HC1 utilizado para valorar los 100 ml del absorbente (ml)

C_B = concentración de la solución de hidróxido de bario (M)

C_A = concentración de la solución de ácido clorhídrico (M).

Si C_B es 0,0125 M y C_A es 0,05 M, el resultado de la valoración de 100 ml de hidróxido de bario es 50 ml y el peso de CO_2 viene dado por:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI valorado} = 1,1 \times \text{ml HCI}$$

Así pues, para pasar el volumen de HC1 valorado a mg de CO_2 producido, el factor en este caso es 1,1.

Se calculan los pesos de CO_2 producido del inóculo solo y del inóculo más la sustancia problema utilizando los respectivos resultados de valoración y la diferencia es el peso de CO_2 producido a partir de la sustancia problema sola.

Por ejemplo, si el inóculo solo da una valoración de 48 ml y el inóculo con la sustancia problema da 45 ml,

CO_2 del inóculo = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 del inóculo con la sustancia problema = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

y, por tanto, el peso de CO_2 producido a partir de la sustancia problema es 3,3 mg.

El porcentaje de biodegradación se calcula con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ producido} \times 100}{CO_2T \times \text{mg de substancia problema añadida}}$$

o bien

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ producido} \times 100}{\text{mg COT añadido en la prueba} \times 3,67}$$

3,67 es el factor de conversión (44/12) para pasar de carbono a dióxido de carbono.

El porcentaje de degradación tras un intervalo cualquiera de tiempo se obtiene sumando los valores porcentuales de CO_2T calculados para cada uno de los días hasta el momento en que se haya medido.

En el caso de absorbentes de hidróxido de sodio, la cantidad de dióxido de carbono producido, expresado como CI (mg) se calcula multiplicando la concentración de CI en el absorbente por el volumen de este.

El porcentaje de degradación se calcula con la fórmula siguiente:

$$\% \ CO_2T = \frac{\text{mg CI del matraz problema} - \text{mg CI del blanco}}{\text{MG COT añadido como substancia problema}} \times 100$$

La pérdida de COD se calcula opcionalmente según se describe en 1.7. Se registran estos resultados y todos los demás en las fichas de datos mencionadas.

IV.3.2. **Validez de los resultados**

El contenido en CI de la suspensión de sustancia problema en el medio mineral al inicio de la prueba debe ser inferior al 5 % del CT, y el desprendimiento total de CO_2 en el blanco con inóculo al final de la prueba no debe exceder normalmente de 40 mg/l por término medio. Si se obtienen valores superiores a 70 mg CO_2/l, es necesario revisar críticamente los datos y la técnica experimental.

Véase también el punto I.5.2.

IV.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

IV.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se presenta un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE DIÓXIDO DE CARBONO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:…

Concentración de la solución madre: … mg/l en sustancia química

▼B

Concentración inicial en el medio: … mg/l en sustancia química

Carbono total añadido al matraz: … mg C

CO_2T: … mg CO_2

4. **INOCULO**

Fuente: …

Tratamiento realizado: …

Acondicionamiento previo en su caso: …

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: … mg/l

Tiemp (día)	CO_2 formado (mg)		CO_2 formado blanco (mg)		$C0_2$ formado acumulado (mg) (ensayo menos blanco)		% CO_2 $\frac{CO_2 \text{ acumulado}}{CO_2T} \times 100$		
	1 / 2	media	3 / 4	media	1	2	1	2	media
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: Pueden utilizarse otros formatos similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad

5. **PRODUCCION DE DIOXIDO DE CARBONO Y DEGRADABILIDAD:**

Método: $Ba(OH)_2$/NaOH/otro

6. **ANALISIS DE CARBONO** (opcional)

Analizador de carbono:

Tiempo (día)	blanco mg/l	sustancia problema mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) O al final de la incubación.

▼B

$$\% \text{ COD eliminado } = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADACIÓN ABIÓTICA** (opcional)

$$\% \text{ degrad. abiót.} = \frac{\text{formac. de } CO_2 \text{ en el matraz estéril tras 28 días (mg)}}{CO_2T \text{ (mg)}} \times 100$$

PARTE V. **RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA** (Método C.4-D)

V.I. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se somete a agitación en un frasco cerrado a temperatura constante (± 1 ºC o más exacto), durante 28 días, un volumen medido de medio mineral inoculado que contenga una concentración conocida de la sustancia química de ensayo (100 mg/l de la sustancia de ensayo, para dar al menos 50-100 mg DTO/l) como única fuente nominal de carbono orgánico. Se determina el consumo de oxígeno midiendo la cantidad de oxígeno (producido por electrólisis) requerido para mantener un volumen constante de gas en el frasco del respirómetro, o a partir de los cambios de volumen o presión (o una combinación de ambas cosas) en el aparato. El dióxido de carbono producido se absorbe en una solución de hidróxido potásico u otro absorbente adecuado. La cantidad de oxígeno consumido por la sustancia problema (corregida según el consumo del blanco con inóculo, realizada en paralelo) se expresa como porcentaje de DTO o DQO. Opcionalmente, se puede calcular también la biodegradación primaria mediante un análisis adicional específico realizado al comienzo y al final de la incubación, y la biodegradación última mediante un análisis de COD.

V.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

V.2.1. **Equipo**

a) Respirómetro adecuado.

b) Control de temperatura, manteniéndolo con un margen de ± 1 ºC o más exacto.

c) Conjunto de membrana y filtros (opcional).

d) Analizador de carbono (opcional).

V.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de las soluciones madre, véase I.6.2.

Mezclar 10 ml de la solución (a) con 800 ml de agua de dilución, añadir 1 ml de las soluciones (b) a (d) y enrasar hasta 1 l con agua de dilución.

V.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 y I.6.5.

V.2.4. **Preparación de los frascos**

Preparar soluciones de las sustancias problema y de referencia, en lotes separados, en un medio mineral equivalente a una concentración, normalmente, de 100 mg de sustancia/l (que dé al menos 50-100 mg DTO/l) utilizando soluciones madre.

▼B

Calcular la DTO sobre la base de la formación de sales de amonio salvo que se prevea nitrificación; en este caso, el cálculo debe basarse en la formación de nitratos (véase el anexo II.2).

Determinar los valores de pH y, si es necesario, ajustarlos a 7,4 ± 0,2.

Las sustancias débilmente solubles deben añadirse en un estadio posterior (véase más abajo).

Si hay que determinar la toxicidad de la sustancia problema, preparar posteriormente otra solución en medio mineral que contenga tanto la sustancia problema como la de referencia a las mismas concentraciones que las utilizadas para el ensayo.

Si se necesita una medida del consumo fisicoquímico de oxígeno, preparar una solución de la sustancia problema, generalmente, a una concentración de 100 mg DTO/1. Esterilizar dicha solución mediante la adición de una sustancia tóxica adecuada (véase el punto I.6.6).

Introducir en frascos, al menos por duplicado, el volumen necesario de soluciones de sustancias problema y de referencia. Añadir a los siguientes frascos solamente medio mineral (para controles de inóculos) y, si es necesario, la solución con mezcla de sustancia problema y de referencia y la solución estéril.

Si la sustancia problema es poco soluble, se añadirá directamente en este estadio basándose en el volumen o en el peso o actuando como se describe en el anexo III. Añadir hidróxido de potasio con cal sodada u otro absorbente a los compartimentos de absorción de CO_2.

V.2.5. **Número de frascos en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril

Matraz 7: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

V.2.6. **Realización del ensayo**

Se deja que los recipientes alcancen la temperatura deseada y se inoculan los recipientes adecuados con lodo activado preparado u otra fuente de inóculo para obtener una concentración de sólidos suspendidos no superior a 30 mg/l. Se monta el equipo, se pone en marcha el agitador y se controla la impermeabilidad al aire, comenzando en este momento la medición del consumo de oxígeno. Generalmente no hay que hacer más que tomar las lecturas necesarias y los controles diarios para asegurarse de que se mantienen la temperatura correcta y la agitación adecuada.

Calcular el consumo de oxígeno según las lecturas tomadas a intervalos frecuentes y regulares, utilizando los métodos proporcionados por el fabricante del equipo. Ai final de la incubación, normalmente 28 días, medir el pH del contenido de los frascos, especialmente si el consumo de oxígeno es inferior o superior a la DTO_{NH4} (en aquellos compuestos que contengan nitrógeno).

▼B

Si es necesario, se tomarán muestras de los frascos del respirómetro, al comienzo y al final, para analizar el COD o realizar un análisis químico específico (véase el anexo II.4). Cuando se haga la primera toma de muestras, hay que asegurarse de que se conoce el volumen de suspensión problema que queda en el frasco. Cuando la sustancia problema nitrogenada consuma oxígeno, determinar el aumento de la concentración de nitrito y nitrato en 28 días y calcular la corrección teniendo en cuenta el oxígeno consumido por nitrificación (véase el anexo V).

V.3. DATOS E INFORME

V.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Dividir el consumo de oxígeno (mg) de la sustancia problema después de un tiempo dado (corregido según el blanco con inóculo después del mismo tiempo) entre el peso de la sustancia problema utilizada. Esto dará la DBO expresada en mg de oxígeno/mg de sustancia problema, es decir

$$\text{DBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido por la sust. problema } - \text{ } O_2 \text{ consumido por el blanco})}{(\text{mg de substancia problema en el frasco})}$$

= mg de O_2 por mg de substancia problema

calcular el porcentaje de biodegradación, bien a partir de:

$$\%\text{ de biodegradación} = \%\text{ DOT} = \frac{\text{DBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})}{\text{DOT}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})} \times 100,$$

o bien de:

$$\%\text{ DQO} = \frac{\text{DBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})}{\text{DQO}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})} \times 100$$

Debe señalarse que estos dos métodos no dan necesariamente el mismo valor. Es preferible usar el primero.

En el caso de sustancias a examinar que contengan nitrógeno, se utiliza la DTO (NH_4 o NO_3) adecuada según se espere o se sepa que va haber nitrificación o no (véase el anexo II.2). Si hay nitrificación pero no es completa, se calcula una corrección según el oxígeno consumido por nitrificación basándose en los cambios de la concentración de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

Cuando se hagan determinaciones opcionales de carbono orgánico o análisis químicos específicos, calcular la degradación porcentual, tal como se describe en el punto I.7.

Registrar todos los resultados en las fichas de datos adjuntas.

V.3.2. **Validez de los resultados**

El consumo de oxígeno del blanco con inóculo es normalmente de 20-30 mg O_2/l y no debe ser superior a 60 mg/l en 28 días. Los valores superiores a 60 mg/l exigirán un examen crítico de los datos y de las técnicas experimentales. Si el valor del pH está fuera del rango 6-8,5 y el consumo de oxígeno por la sustancia problema es inferior al 60 %, debe repetirse el ensayo con menor concentración de la sustancia problema.

Véase también el punto I.5.2.

▼B

V.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

V.4. **FICHA DE RECOGIDA DE DATOS**

A continuación se da un ejemplo de una ficha de recogida de datos.

RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre: …

Concentración de la solución madre: … mg/l

Concentración inicial en el medio, C_o: … mg/l

Volumen en el matraz de prueba (V): … ml

DTO de sustancia/DQO de sustancia: … mg O_2/mg de sustancia a examinar (NH_4, NO_3)

4. **INÓCULO**

Fuente: …

Tratamiento realizado: …

Acondicionamiento previo en su caso: …

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: … mg/l

5. **CONSUMO DE OXÍGENO: BIODEGRADABILIDAD**

		Tiempo (dias)											
		0		7		14			21			28	
O_2 consumido (mg) sust. problema	1												
	2												
	a, media												
O_2 consumido (mg) blanco	3												
	4												
	b, media												
DBO (mg) corregida	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
DBO por mg de sustancia problema	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tiempo (dias)											
		0		7		14			21			28	
% degradación	D_1 (a_1)												
$\frac{DBO}{DOT} \times 100$	D_2 (a_2)												
	Media (*)												

V = volumen de medio en los frascos del ensayo.
(*) Si existe una diferencia considerable entre D_1 y D_2, no debe calcularse el término medio.

Nota: Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. **CORRECCIÓN POR NITRIFICACIÓN** (véase el anexo V)

Día		0	28	Diferencia
(i)	Concentración de nitrato (mg N/l)			(N)
(ii)	Equivalente de oxígeno (4,57 × N × V) (mg)	—		
(iii)	Concentración de nitrito (mg N/l)			(N)
(iv)	Equivalente de oxígeno (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Equivalente total de oxígeno	—	—	

7. **ANÁLISIS DE CARBONO** (opcional)

Analizador de carbono:

Tiempo (da)	Blanco mg/l	Sustancia problema mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) O al final de la incubación.

$$\% \text{ COD eliminado} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO** (opcional)

S_b = concentración en el control fisicoquímico (estéril) a los 28 días.

S_a = concentración en el frasco inoculado a los 28 días.

$$\% \text{ biodegradación} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADACIÓN ABIÓTICA** (opcional)

a = consumo de oxígeno en frascos estériles después de 28 días, mg.

$$\text{consumo de oxígeno por rag de sustancia problema} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(véanse las secciones 1 y 3)

$$\% \text{ degradación abiótica} = \frac{a \times 100}{C_o V \times DTO}$$

PARTE VI. **ENSAYO DEL FRASCO CERRADO** (Método C.4-E)

VI. 1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se prepara una solución de la sustancia problema en medio mineral, generalmente con una concentración de 2-5 mg/l. Esta solución se inocula con un número relativamente pequeño de microorganismos de una población mixta y se mantiene en frascos cerrados completamente llenos, en la oscuridad y a temperatura constante. La degradación se sigue mediante el análisis del oxígeno disuelto durante un período de 28 días. La cantidad de oxígeno consumido por la sustancia problema, corregido según el consumo de oxígeno por parte del blanco con inóculo realizado en paralelo, se expresa como porcentaje de DTO o DQO.

VI.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

VI.2.1. **Equipo**

a) Frascos de DBO, con tapones de cristal de, por ejemplo, 250-300 ml.

b) Baño maría o incubadora, para mantener los frascos a temperatura constante (± 1 ºC o más exacto) en la oscuridad.

c) Frascos de cristal grandes (2-5 1) para la preparación de medios y para rellenar los frascos de DBO.

d) Electrodo de oxígeno y oxímetro o equipamiento y reactivos para la valoración según Winkler,

VI.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Mezclar 1 ml de las soluciones (a) a (d) y rellenar hasta 1 l con agua de dilución.

VI.2.3. **Preparación del inóculo**

El inóculo se deriva normalmente de un efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Otra fuente posible de inóculo es el agua superficial. Utilizar normalmente desde una gota (0,05 ml) hasta 5 ml de filtrado por litro de medio; se pueden necesitar varias pruebas para descubrir el volumen óptimo para un efluente dado. (Véanse los puntos I.6.4.2 y I.6.5)

VI.2.4. **Preparación de los frascos**

Se airea intensamente el medio mineral durante 20 minutos por lo menos. Realizar cada serie de ensayos con el mismo medio mineral. Generalmente, el medio está listo para su uso después de dejarlo reposar 20 horas, a la temperatura del ensayo. Determinar la concentración de oxígeno disuelto como control; debe dar un valor de unos 9 mg/l a 20 ºC. Todas las operaciones de transferencia y llenado de medio saturado de aire y sin burbujas, se harán, por ejemplo, mediante sifones.

▼B

Se preparan grupos paralelos de frascos de DBO para la determinación de sustancias problema y de referencia en series experimentales simultáneas. Reunir un número suficiente de frascos de DBO, incluyendo blancos con inóculo, para permitir hacer, al menos por duplicado, mediciones de consumo de oxígeno a los intervalos deseados, por ejemplo, a los 0, 7, 14, 21 y 28 días. Pueden ser necesarios más frascos si se quiere determinar el período de observación de 10 días.

Se añade medio mineral bien aireado a frascos grandes de manera que estén llenos aproximadamente hasta un tercio de su capacidad. A continuación se añade suficiente cantidad de las soluciones madre de las sustancias problema y de las sustancias de referencia a frascos grandes por separado de forma que la concentración final de las sustancias químicas no exceda normalmente de 10 mg/l. No se añadirá ninguna sustancia al blanco de control contenido en otro frasco grande.

La concentración de oxígeno disuelto no debe bajar por debajo de 0,5 mg/l en los frascos de DBO, para poder garantizar la no limitación de la actividad del inóculo. Esto limita la concentración de la sustancia problema a unos 2 mg/l. Sin embargo, en caso de compuestos poco degradables y de aquéllos que tienen baja DTO, puede usarse una concentración de 5-10 mg/l. En algunos casos, es aconsejable realizar series paralelas de sustancias problema a dos concentraciones diferentes, por ejemplo, 2 y 5 mg/l. Normalmente, se calculará la DTO basándose en la formación de sales de amonio pero, si se espera o se sabe que va a haber nitrificación, se calculará basándose en la formación de nitrato (DTO_{NO3}: véase el anexo II.2). No obstante, si hay nitrificación pero no es completa, se corregirá de acuerdo con los cambios en la concentración de nitrito y nitrato, determinada por análisis (véase el anexo V).

Si se va a investigar la toxicidad de la sustancia problema (en el caso, por ejemplo, de que se haya encontrado previamente un valor de biodegradabilidad bajo), será necesaria otra serie de frascos.

Se prepara otro frasco grande que contenga medio mineral aireado (alrededor de un tercio de su volumen) más la sustancia problema y la de referencia a concentraciones finales normalmente iguales a las de los otros frascos grandes.

Se inoculan las soluciones en los frascos grandes con efluente secundario (desde una gota, alrededor de 0,05 ml, hasta 5 ml/l) o con otra fuente como agua de río (véase el punto I.6.4.2). Finalmente se llevan las soluciones al volumen deseado con medio mineral aireado utilizando un tubo que llegue hasta el fondo del frasco para conseguir una mezcla adecuada.

VI.2.5. **Número de frascos en una serie típica**

En una serie típica se usan los siguientes frascos:

— al menos 10 que contengan la sustancia problema y el inóculo (suspensión de ensayo),

— al menos 10 que solo contengan el inóculo (blanco con inóculo),

— al menos 10 que contengan la sustancia de referencia y el inóculo (control de procedimiento),

▼B

— y, cuando sea necesario, 6 frascos que contengan la sustancia problema, la sustancia de referencia y el inóculo (control de toxicidad). Sin embargo, puede necesitarse al menos el doble de frascos si se desea garantizar la posibilidad de determinar el período de observación de 10 días.

VI.2.6. Realización del ensayo

Se introduce inmediatamente cada solución preparada en el respectivo grupo de frascos de DBO mediante un tubo desde el cuarto inferior (no el fondo) del frasco grande apropiado, de forma que se rellenen completamente todos los frascos de DBO. Se golpea ligeramente para eliminar toda burbuja de aire. Se analizan inmediatamente los frascos para determinar el oxigeno disuelto a tiempo cero, mediante los métodos de Winkler o de electrodo. Pueden preservarse los contenidos de los frascos, para su análisis ulterior, mediante el método de Winkler añadiendo sulfato de manganeso (II) e hidróxido sódico (el primer reactivo del método Winkler); estos frascos, que contienen el oxígeno fijado como óxido hidratado de manganeso (III) (precipitado marrón), se pueden almacenar en la oscuridad y a 10-20 ºC durante no más de 24 horas antes de continuar con el análisis según el método de Winkler. Se tapan los restantes frascos replicados asegurándose de que no quedan burbujas dentro de ellos y se incuban a 20 ºC en la oscuridad. Cada serie debe acompañarse de una serie paralela completa para la determinación en el blanco inoculado. Retirar al menos frascos duplicados de todas las series para el análisis del oxígeno disuelto a intervalos de tiempo (al menos semanalmente) durante los 28 días de incubación.

Las muestras semanales permitirán la valoración del porcentaje de eliminación en un período de observación de 14 días, mientras que las muestras tomadas cada 3 o 4 días permitirán determinar el período de observación de 10 días, lo que requerirá aproximadamente el doble de frascos.

En el caso de las sustancias que contengan nitrógeno, deberán hacerse correcciones del consumo de oxígeno si tiene lugar cualquier tipo de nitrificación. Con este fin, se usará el método del electrodo de O_2 a fin de determinar la concentración de oxígeno disuelto y sacar una muestra del frasco de DBO para análisis de nitrito y nitrato. El oxígeno utilizado se calculará a partir del aumento de concentración de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

VI.3. DATOS E INFORME

VI.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se calcula en primer lugar la DBO obtenida tras cada período de tiempo sustrayendo la depleción de oxígeno (mg O_2/l) del blanco con inóculo de la que presenta la sustancia problema. Se divide esta depleción corregida entre la concentración (mg/l) de la sustancia problema a fin de obtener la DBO específica en mg de oxígeno por mg de sustancia problema, Se calcula la biodegradabilidad porcentual dividiendo la DBO específica entre la DTO específica (calculada de acuerdo con el anexo II.2) o la DQO (determinada por análisis, véase el anexo II.3); así pues:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg de consumo } O_2 \text{ de sustancia problema} - \text{mg } O_2 \text{ consumo blanco}}{\text{mg sustancia problema en el frasco}}$$

▼B

= mg de O_2 por mg de sustancia problema

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}}{\text{DTO(mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}} \times 100$$

o

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}}{\text{DQO(mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}} \times 100$$

En el caso de sustancias que contengan nitrógeno, se utiliza la DTO (NH_4 o NO_3) adecuada según se espere o se sepa que va haber nitrificación o no (véase el anexo II.2), Si hay nitrificación pero no es completa, se calcula una corrección según el oxígeno consumido por nitrificación basándose en los cambios de la concentración de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

VI.3.2. **Validez de los resultados**

La depleción de oxígeno en el blanco con inóculo no debe sobrepasar 1,5 mg de oxígeno disuelto/l después de 28 días. Si hay valores superiores a este, deberá hacerse una revisión de las técnicas experimentales. La concentración residual de oxígeno en los frascos del ensayo no deberá bajar por debajo de 0,5 mg/l en ningún momento. Estos valores tan bajos de oxígeno solo son válidos si el método de determinación del oxigeno disuelto es capaz de medir dichos niveles con exactitud.

Véase también el punto I.5.2

VI.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

VI.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DEL FRASCO CERRADO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:

Concentración de la solución madre: … mg/l

Concentración inicial en el frasco: … mg/l

DTO/DQO: mg O_2/mg de sustancia a examinar

4. **INÓCULO**

Fuente:

Tratamiento realizado:

▼B

Acondicionamiento previo en su caso:

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: … mg/l

5. **DETERMINACIÓN DEL OD**

Método: Winkler/electrodo

Análisis de los frascos

Tiempo de incubación (d)			OD (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blanco sin sustancia problema	1	C_1				
	2	C_2				
Media	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Substancia problema	1	a_1				
	2	a_2				
Media	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Nota: Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. **CORRECCIÓN POR NITRIFICACIÓN** (véase el anexo V)

Tiempo de incubación (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentración de nitrato (mg N/l)				
(ii)	Cambio en la concentración de nitrato (mg N/l)	—			
(iii)	Equivalente de oxígeno (mg/l)	—			
(iv)	Concentración de nitrito (mg N/l)				
(v)	Cambio en la concentración de nitrito (mg N/l)	—			
(vi)	Equivalente de oxígeno (mg/l)	—			
(iii + vi)	Equivalente total de oxígeno (mg/l)	—			

7. **DEPLECIÓN DE OD: % DE DEGRADACIÓN**

	Depleción tras n días (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco 1: $(m_{to} - m_{tx}) — (m_{bo} - m_{bx})$				
Frasco 2: $(m_{to} - m_{tx}) — (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Depleción tras n días (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{del ensayo} \times \text{DTO sustancia}}$				
Frasco 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{del ensayo} \times \text{DTO sustancia}}$				
$\% D \text{ media } (*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) No tener en cuenta si hay una diferencia considerable en las repeticiones.

m_{to} = valor a tiempo 0 en el frasco de la prueba

m_{tx} = valor a tiempo t en el frasco de la prueba

m_{bo} = valor medio del blanco a tiempo 0

m_{bx} = valor medio del blanco a tiempo x

Se aplicará también una corrección según la nitrificación basándose en iii + vi de la sección 6.

8. **DEPLECIÓN DE OD EN EL BLANCO**

Consumo de oxígeno por el blanco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Este consumo es importante para la validez del ensayo. Debe ser menor de 1,5 mg/l.

PARTE VII. **ENSAYO DEL M.I.T.I.** (Método C.4-F)

VII.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se mide automáticamente durante un período de 28 días, en un respirómetro cerrado, a 25 ± 1 ºC y en la oscuridad, el consumo de oxígeno en una solución o suspensión agitada, de la sustancia problema en un medio mineral, inoculado con un inóculo especial de microorganismos no adaptados. El dióxido de carbono producido es absorbido por cal sodada. La biodegradabilidad se expresa como porcentaje de consumo de oxígeno (corregido según el consumo del blanco) sobre el consumo teórico (DTO). El porcentaje de biodegradabilidad primaria se calcula también basándose en los análisis químicos específicos adicionales hechos al comienzo y al final de la incubación y, opcionalmente, por análisis de COD.

VII.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

VII.2.1. **Equipo**

a) Medidor electrolítico automático de DBO o respirómetro normalmente equipado con seis frascos, de 300 ml cada uno y que llevan cápsulas para el absorbente de CO_2.

▼B

b) Temperatura ambiente constante o baño maría a 25 ºC ± 1 ºC o más exacta.

c) Conjunto de membrana y filtros (opcional).

d) Analizador de carbono (opcional).

VII.2.2. **Preparación del medio mineral**

Se prepararán las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de calidad analítica y agua (véase el punto I.6.1):

(a)	Ortofosfato diácido de potasio, KH_2PO_4	8,50 g
	Ortofosfato monoácido de potasio, K_2HPO_4	21,75 g
	Ortofosfato monoácido de sodio dodecahidratado $Na_2HPO_4.12\ H_2O$	44,60 g
	Cloruro amónico, NH_4Cl	1,70 g
	Disolver en agua y enrasar hasta 1 litro	
	El pH de la solución debe ser de 7,2	
(b)	Sulfato de magnesio heptahidratado, $MgSO_4$- 7 H_2O	22,50 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro	
(c)	Cloruro cálcido anhidro, $CaCl_2$	27,50 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro	
(d)	Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3.6\ H_2O$	0,25 g
	Disolver en agua y enrasar a 1 litro	

Se toman 3 ml de cada solución (a), (b), (c) y (d) y se enrasa a 1 litro.

VII.2.3. **Preparación del inóculo**

Se recogen muestras frescas de no menos de 10 puntos, sobre todo en zonas donde se utilicen y viertan diversos productos químicos. En los sitios como las instalaciones de tratamiento de aguas residuales, tratamiento industrial de aguas residuales, ríos, lagos, mares, se recogerá muestras de 1 litro de lodo, suelo superficial, agua, etc. y se mezclarán cuidadosamente. Despues de eliminar la materia flotante y de dejar sedimentar, el sobrenadante se ajustará a pH 7 ± 1 con hidróxido sódico o ácido fosfórico.

Se utiliza un volumen adecuado del sobrenadante filtrado para rellenar un recipiente de decantación de lodo activado y se airea el líquido durante 23 h 30 min. Treinta minutos después de detener la aireación, se elimina alrededor de un tercio del volumen total de sobrenadante y se añade al material sedimentado un volumen igual de una solución (pH 7) que contenga 0,1 % respectivamente de glucosa, peptona y ortofosfato monopotásico, volviendo a comenzar la aireación. Este procedimiento se repite una vez al día. La unidad de lodo funcionará de acuerdo con las prácticas correctas: los efluentes deben estar limpios, la temperatura debe permanecer a 25 ± 2 ºC, el pH debe ser 7 ± 1, el lodo debe estar bien sedimentado, debe haber aireación suficiente para mantener la mezcla en aerobiosis en todo momento, los protozoos deben estar presentes; al menos cada tres meses se hará un ensayo de la actividad del lodo frente a una sustancia de referencia. No se debe utilizar lodo como inóculo hasta al menos un mes después de la operación, pero no más de cuatro meses después. Posteriormente, tomar muestras de al menos 10 sitios a intervalos regulares, una vez cada tres meses.

▼B

A fin de mantener la misma actividad en el lodo reciente y en el antiguo, se mezcla el sobrenadante filtrado de un lodo activado en uso con un volumen igual de sobrenadante filtrado de una mezcla reciente recogida de diez fuentes y se cultiva el líquido combinado tal como se ha dicho anteriormente. Se toma el lodo para usarlo como inóculo de 18 a 24 horas después de haber alimentado la unidad.

VII.2.4. **Preparación de los frascos**

Se preparan los seis frascos siguientes:

Nº 1: sustancia problema en agua de dilución en concentración de 100 mg/l.

Nºs 2, 3 y 4: sustancia problema en medio mineral en concentración de 100 mg/l.

Nº 5: sustancia de referencia (por ejemplo, anilina) en medio mineral en concentración de 100 mg/l.

Nº 6: medio mineral solo.

Las sustancias problema poco solubles se añaden directamente calculadas en peso o en volumen o se actúa como se describe en el anexo III, excepto que no se utilizan ni disolventes ni agentes emulsificantes. Se añade el absorbente de CO_2 a todos los frascos en las cápsulas especiales. Se ajusta el pH a 7,0 en los frascos nºs 2, 3 y 4.

VII.2.5. **Realización del ensayo**

Se inoculan los frascos nºs 2, 3 y 4 (suspensiones problema), nº 5 (control de actividad) y nº 6 (blanco con inóculo) con un pequeño volumen del inóculo de manera que dé una concentración de 30 mg/l de sólidos suspendidos. No se añade inóculo al frasco nº 1 que sirve como control abiótico. Se monta el equipo, se controla la impermeabilidad al aire, se ponen en marcha los agitadores y se comienza la medición del consumo de oxígeno en condiciones de oscuridad. Se controla diariamente la temperatura, el agitador y el registrador culombimétrico de consumo de oxígeno, tomando nota de cualquier cambio de color del contenido de los frascos. El consumo de oxígeno se leerá directamente de los seis frascos por un método apropiado, por ejemplo a partir del registrador gráfico de seis puntos, dando lugar a una curva de DBO. Al final de la incubación, normalmente 28 días, se mide el pH del contenido de los frascos y se determina la concentración de la sustancia problema y/o residual y cualquier intermediario y, en el caso de una sustancia soluble en el agua, la concentración de COD (véase el anexo II.4). Se tendrá un cuidado especial en el caso de sustancias volátiles. Si se supone que va a haber nitrificación, se determina la concentración de nitrato y de nitrito en la medida de lo posible.

VII.3. DATOS E INFORME

VII.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se divide el consumo de oxígeno (mg) de la sustancia problema después de un tiempo dado, corregido según el consumo del blanco con inóculo después del mismo tiempo, entre el peso de la sustancia problema utilizada. Con ello obtenemos la DBO expresada en mg de oxígeno/mg de sustancia problema, es decir:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg de consumo de } O_2 \text{ sustancia problema} - \text{mg de } O_2 \text{ consumo blanco}}{\text{mg sustancia problema en el frasco}}$$

= mg O_2/mg substancia problema

▼B

La biodegradación porcentual se obtiene de la siguiente manera:

$$\% \text{ biodegradación} = \% \text{ DTO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2\text{/mg sustancia)}}{\text{DTO (mg } O_2\text{/mg sustancia)}} \times 100$$

En las mezclas, se calcula la DTO basándose en el análisis elemental, como si fuera una sustancia simple. Se utilizará la DTO adecuada (DTO_{NH4} o DTO_{NO3}) según haya nitrificación nula o completa (véase el anexo II.2). No obstante, si hay nitrificación pero es incompleta, se corregirá según el oxígeno consumido por la nitrificación, calculado según los cambios en las concentraciones de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

Se calcula el porcentaje de biodegración primaria a partir de la pérdida de sustancia química originaria específica (véase el punto I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Si ha habido en el frasco No. 1 una pérdida de sustancia problema que dé la medida de la eliminación fisicoquímica, se informará de ello y se utilizará la concentración de la sustancia problema (S_b) después de 28 días en este frasco para calcular el porcentaje de biodegradación.

Cuando se hagan determinaciones de COD opcional), el porcentaje de biodegradación última se calculará con la siguiente fórmula:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

como se describe en el punto I.7.1. Si ha habido en el frasco nº 1 una pérdida de COD, que mide la eliminación fisicoquímica, se utilizará la concentración de COD en este frasco para calcular el porcentaje de biodegradación.

Se registrarán todos los resultados en la ficha de datos adjunta.

VII.3.2. **Validez de los resultados**

El consumo de oxígeno del blanco con inóculo es normalmente de 20 a 30 mg O_2/l y no debe ser mayor de 60 mg/l en 28 días. Los valores superiores a 60 mg/l exigirán una revisión crítica de los datos y de las técnicas experimentales. Si el pH cae fuera del rango 6-8,5 y el consumo de oxígeno con la sustancia problema es menor del 60 %, debe repetirse el ensayo con una concentración inferior de la sustancia problema.

Véase también el punto I.5.2.

Si el porcentaje de degradación de anilina calculado a partir del consumo de oxígeno no excede del 40 % después de 7 días y del 65 % después de 14 días, el ensayo se considerará no válido.

VII.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

VII.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de una ficha de recogida de datos.

PRUEBA DEL MITI (I)

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

▼B

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre: . . .

Concentración de la solución madre: … mg/l, en sustancia

Concentración inicial en el medio, C_o: … mg/l, en sustancia

Volumen de la mezcla de reacción, V: … ml

DTO de la sustancia: … mg O_2/l

4. **INÓCULO**

Puntos de muestreo del lodo:

1) … 6) …
2) … 7) …
3) … 8) …
4) … 9) …
5) … 10) …

Concentración de sólidos en suspensión en el lodo activado tras aclimatación con vertidos sintéticos … mg/l

Volumen de lodo activado por litro de medio final = … ml

Concentración de lodo en el medio final = … mg/l

5. **CONSUMO DE OXÍGENO: BIODEGRADABILIDAD**

Tipo de respirómetro usado:

			Tiempo (dias)				
			0	7	14	21	28
Consumo O_2 (mg) de la substancia problema	a_1						
	a_2						
	a_3						
Consumo O_2 (mg) blanco	b						
Consumo O_2 corregido (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
DBO por mg de sustancia problema	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Frasco 1					
		Frasco 2					
		Frasco 3					
% degradación $\frac{DBO}{DTO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		media (*)					

(*) No tener en cuenta si hay una diferencia considerable en las repeticiones.

▼B

Nota: Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. **ANÁLISIS DE CARBONO** (opcional)

Analizador de carbono:

Matraz	COD				% COD eliminado	Media
	Medido		Corregido			
Agua + sustancia a examinar	a					
Lodo + sustancia a examinar	b_1		b_1-c			
Lodo + sustancia a examinar	b_2		b_2-c			
Lodo + sustancia a examinar	b_3		b_3-c			
Control blanco	c		—			

$$\% \text{ COD eliminado} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO**

	Cantidad residual de sust. problema al final del ensayo	% degradación
Ensayo blanco con agua	S_b	
Medio inoculado	S_{al}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradación} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calcular % de degradación de los frascos a_1 a_2 y a_3 respectivamente.

8. **COMENTARIOS**

Se adjuntará una curva de DBO en función del tiempo, si se disponede ella.

▼B

Anexo I

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

OD: Oxígeno disuelto (mg/l); es la concentración de oxígeno disuelto en una muestra acuosa.

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno (g); es la cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos que metabolizan una sustancia problema; se expresa también como gramos de oxígeno consumido por gramo de sustancia problema. (Véase el método C.5.).

DQO: Demanda química de oxígeno (g); es la cantidad de oxígeno consumido durante la oxidación de una sustancia problema con dicromato en medio ácido caliente. Proporciona una medida de la cantidad de sustancia oxidable presente; se expresa también como gramos de oxígeno consumido por gramo de sustancia problema. (Véase el método C.6.)

COD: Carbono orgánico disuelto; es el carbono orgánico presente en solución o el que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros o permanece en el sobrenadante tras centrifugación a 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) durante 15 minutos.

DTO: Demanda teórica de oxígeno (mg); es la cantidad total de oxígeno necesario para oxidar completamente una sustancia; se calcula basándose en la fórmula molecular (véase el anexo II.2) y se expresa también como mg de oxígeno requeridos por mg de sustancia problema.

CO_2T: Dióxido de carbono teórico (mg); es la cantidad de dióxido de carbono que se calcula que va a producirse a partir del contenido en carbono, conocido o medido, de la sustancia problema cuando se mineraliza completamente; se expresa también como mg de dióxido de carbono producido por mg de sustancia de ensayo.

COT: Carbono orgánico total; es la suma total del carbono orgánico en solución y en suspensión en una muestra.

CI: Carbono inorgánico,

CT: Carbono total; es el total del carbono orgánico e inorgánico presente en una muestra.

Biodegradación primaria:

Es la alteración de la estructura química de una sustancia, producida por acción biológica y que da lugar a la pérdida de las propiedades específicas de esa sustancia.

Biodegradación última (aerobia):

Es el nivel de degradación al que llega la sustancia de ensayo cuando es totalmente utilizada por microorganismos dando lugar a la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

Fácilmente biodegradable:

Categoría arbitraria de sustancias químicas que han pasado determinados ensayos específicos de clasificación en cuanto a la biodegradabilidad última; estos ensayos son tan estrictos que es asumido que, según ellos, estos compuestos deben degradarse rápida y completamente en medio ambiente acuático en condiciones de aerobiosis.

▼B

Intrínsecamente biodegradable:

Categoría de sustancias químicas en las que hay evidencia inequívoca de biodegradación (primaria o última) en un ensayo de biodegradabilidad reconocido.

Tratabilidad:

Es la capacidad de las sustancias de ser eliminadas durante el tratamiento biológico de los residuos acuosos sin afectar negativamente ai funcionamiento normal de los procesos de tratamiento. Generalmente, los compuestos fácilmente biodegradables son tratables, pero no todos los compuestos intrínsecamente biodegradables son tratables. Pueden darse también procesos abióticos.

Tiempo de latencia

En una prueba de pérdida, es el tiempo transcurrrido desde la inoculación hasta que el porcentaje de degradación aumenta hasta al menos el 10 %. El tiempo de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

Tiempo de degradación

Es el tiempo transcurrido desde el final del tiempo de latencia hasta el momento en que se alcanza el 90 % del nivel máximo de degradación.

Período de observación de 10 días

Son los 10 días que siguen inmediatamente al momento en que se alcanza el 10 % de degradación.

▼B

Anexo II

CÁLCULO Y DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS INDICATIVOS ADECUADOS

Dependiendo del método elegido, se necesitarán determinados parámetros indicativos. La sección siguiente describe el cálculo de esos valores. El uso de estos parámetros se describe en cada uno de los métodos.

1. **Contenido en carbono**

El contenido en carbono se calcula basándose en la composición elemental conocida o determinada por análisis elemental de la sustancia problema.

2. **Demanda teórica de oxígeno (DTO)**

La demanda teórica de oxígeno (DTO) puede calcularse si se conoce la composición.elemental o se determina mediante análisis elemental. Para un compuesto:

$C_cH_hCl_dN_nNa_{na}O_0P_pS_s$

sin nitrificación,

$$DTO_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{Pm}\ mg/mg$$

o con nitrification

$$DTO_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{Pm}\ mg/mg$$

3. **Demanda química de oxígeno (DQO)**

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina de acuerdo con el método C.6.

4. **Carbono orgánico disuelto (COD)**

El carbono orgánico disuelto (COD) es, por definición, el carbono orgánico de cualquier sustancia o mezcla de sustancias en agua que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros.

Se toman muestras de los recipientes de ensayo y se filtran inmediatamente en el equipo de filtración utilizando un filtro de membrana adecuado. Se desprecian los primeros 20 ml de filtrado (puede disminuirse la cantidad si se utilizan filtros más pequeños). Si se inyectan volúmenes de 10 a 20 ml o menores (el volumen depende de la cantidad necesaria para el analizador de carbono), se guardan para el análisis de carbono. La concentración de COD se determina mediante un analizador de carbono orgánico capaz de medir exactamente una concentración de carbono equivalente o inferior al 10 % de la concentración de COD inicial utilizada en el ensayo.

Las muestras filtradas que no puedan analizarse en el mismo día de trabajo pueden conservarse almacenadas en un refrigerador a 2-4 ºC durante 48 horas, o por debajo de - 18 ºC durante períodos más prolongados.

Comentarios:

Los filtros de membrana vienen a menudo impregnados con agentes tensoactivos para hacerlos hidrófilos. Así pues, el filtro puede contener varios mg de carbono orgánico soluble que puede interferir en las determinaciones de biodegradabilidad. Los agentes tensoactivos y otros compuestos orgánicos solubles se eliminan de los filtros hirviendo éstos en agua desionizada durante tres períodos de 1 hora cada uno. Los filtros pueden almacenarse a continuación en agua durante una semana. Si se utilizan cartuchos de filtro de un solo uso, cada lote debe controlarse para confirmar que no libera carbono orgánico soluble.

▼B

Dependiendo del tipo de filtro de membrana, la sustancia puede ser retenida por absorción. Por ello, es aconsejable asegurarse de que la sustancia problema no queda retenida en el filtro.

Puede usarse centrifugación, en lugar de filtración, a 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) durante 15 minutos para diferenciar el COT del COD. El método no es fiable con una concentración inicial < 10 mg COD/l ya que ni se eliminan todas las bacterias ni se redisuelve el carbono que forma parte del plasma bacteriano.

REFERENCIAS

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersu chung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoff bedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

Anexo III

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS POCO SOLUBLES

Debe prestarse una atención especial, en los ensayos de biodegradabilidad de sustancias poco solubles, a los aspectos siguientes.

Aunque los líquidos homogéneos rara vez presentarán problemas de muestreo, se recomienda homogeneizar los materiales sólidos por medios apropiados para evitar errores debidos a la no homogeneidad. Debe prestarse una atención especial cuando se necesiten muestras representativas de unos miligramos tomadas de mezclas de sustancias químicas o de sustancias con grandes cantidades de impurezas.

Pueden utilizarse durante los ensayos diversas formas de agitación. Debe tenerse cuidado de usar solo la agitación suficiente para mantener la dispersión de la sustancia, evitando el sobrecalentamiento, la formación excesiva de espuma y las fuerzas de cizallamiento excesivas.

Puede utilizarse un emulsificante que dé una dispersión estable de la sustancia química. Debe ser atóxico para las bacterias y no debe biodegradarse ni producir espuma en las condiciones del ensayo.

Se aplicarán a los solventes los mismos criterios que a los emulsificantes.

No se recomienda utilizar vehículos sólidos para los ensayos de sustancias sólidas, pero pueden ser adecuados en el caso de sustancias oleosas.

Cuando se utilicen sustancias auxiliares corno emulsificantes, solventes y portadores, debe realizarse un ensayo en blanco con las sustancias auxiliares.

Puede utilizarse para estudiar la biodegradabilidad de las sustancias poco solubles cualquiera de los tres ensayos respirométricos CO_2, DBO o MITI.

REFERENCIAS

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly- soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradabiliry testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Anexo IV

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE PUEDEN SER TÓXICAS PARA EL INÓCULO

Cuando se someta una sustancia química a ensayos de biodegradabilidad fácil y se vea que no es biodegradable, se recomienda el procedimiento siguiente si se desea distinguir si la sustancia es inhibidora o es inerte (Reynolds et al.; 1987).

Deben utilizarse inóculos similares o idénticos para los ensayos de toxicidad y de biodegradación.

Cuando se considere necesario disponer de un medio para valorar la toxicidad de las sustancias químicas estudiadas en los ensayos de biodegradabilidad fácil, puede ser apropiado aplicar uno o varios de los métodos siguientes: inhibición de la tasa de respiración del lodo (ensayo de inhibición de respiración del lodo activado — Directiva 88/302/CEE), DBO o inhibición del crecimiento.

Si hay que evitar la inhibición debida a la toxicidad, se sugiere que las concentraciones de la sustancia problema utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad fácil sean inferiores a 1/10 de la CE_{50} (o inferiores a los valores de la CE_{20}) obtenida en los ensayos de toxicidad. No es probable que sustancias con una CE_{50} superior a 300 mg/l tengan efectos tóxicos en los ensayos de biodegradabilidad fácil.

Los valores EC_{50} inferiores a 20 mg/l pueden presentar problemas en las pruebas subsiguientes. Se emplearán bajas concentraciones de ensayo, haciendo necesario el uso de pruebas sensibles y estrictas como el ensayo del frasco cerrado o el uso de material marcado con ^{14}C. Como alternativa, un inóculo aclimatado puede permitir el uso de concentraciones más elevadas de la sustancia problema. En este último caso, sin embargo, se pierde el criterio específico del ensayo de biodegradabilidad fácil.

REFERENCIAS

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

Anexo V

CORRECCIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO POR INTERFERENCIA DE LA NITRIFICACIÓN

Si la sustancia problema no contiene nitrógeno, los errores debidos a no tener en cuenta la nitrificación, en el cálculo del consumo de oxígeno, son despreciables (no superiores al 5 %), incluso si la oxidación del N amónico en el medio se da irregularmente en los distintos recipientes de ensayo y blanco. No obstante, en el caso de sustancias que contienen N, pueden darse errores graves.

Si ha habido nitrificación pero no es completa, el consumo de oxígeno que se ha observado en la mezcla de reacción puede corregirse según la cantidad de oxígeno utilizado para oxidar el amonio a nitrito y nitrato, sí se determinan los cambios en la concentración del nitrito y del nitrato durante la incubación mediante las ecuaciones siguientes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalmente:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

En la ecuación (1) el consumo de oxigeno por 28 g de nitrógeno contenidos en cloruro amónico (NH_4Cl) al ser oxidado a nitrito es de 96 g, es decir, un factor de 3,43 (96/28). Del mismo modo, en la ecuación (3) el consumo de oxígeno por 28 g de nitrógeno al ser oxidado a nitrato es de 128 g, es decir, un factor de 4,57 (128/28).

Como las reacciones son *secuenciales*, desencadenadas por especies bacterianas diferentes bien determinadas, es posible que la concentración de nitrito aumente o disminuya; en este último caso, se formará una concentración equivalente de nitrato. Así pues, el oxígeno consumido en la formación de nitrato es 4,57 multiplicado por el aumento de la concentración de nitrato, mientras que el oxígeno relacionado con la formación de nitrito es 3,43 multiplicado por el aumento en la concentración de nitrito o bien con la disminución de su concentración, la pérdida de oxígeno es - 3,43 multiplicado por la disminución de la concentración.

Es decir:

O_2 consumido en la formación de nitrato-N = 4,57 × aumento en la concentración de nitrato *Y* (4)

O_2 consumido en la formación de nitrito-N = 3,43 × aumento en la concentración de nitrito (5)

y

O_2 perdido en la desaparición de nitrito-N = - 3,43 × disminución en la concentración de nitrito de forma que (6)

consumo de O_2 debido a la nitrificación = ± 3,43 × cambio en concentración de nitrito-N + 4,57 × aumento en concentración de nitrato (7)

y, por consiguiente,

consumo de O_2 debido a oxidación del C = consumo total observado menos consumo debido a nitrificación (8)

Si solo se determina el N oxidado total, puede considerarse que el consumo de oxígeno debido a la nitrificación es, como primera aproximación, 4,57 × aumento del N oxidado.

El valor corregido del consumo de oxígeno debido a la oxidacion del C se compara entonces con la DTO NH_4 tal como se calcula en el anexo II.

▼B

C.5. DEGRADACIÓN: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del ensayo es medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de las sustancias orgánicas, sólidas o líquidas.

Los resultados que se obtienen con este método de ensayo son representativos, sobre todo, cuando se aplica a los compuestos hidrosolubles; no obstante, al menos en principio, el método puede hacerse extensible a los compuestos volátiles y los compuestos de baja hidrosolubilidad.

El método solo es aplicable a las sustancias orgánicas que no produzcan efectos inhibidores sobre las bacterias a la concentración de ensayo. Si la sustancia de ensayo no es soluble a la concentración de ensayo, se puede recurrir a procedimientos especiales, tales como la dispersión por ultrasonidos, a fin de lograr una dispersión satisfactoria de la sustancia de ensayo.

Es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia para poder interpretar los resultados bajos y para elegir la concentración de ensayo adecuada.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La DBO se define como la masa de oxígeno disuelto necesario para asegurar, en condiciones determinadas, la oxidación bioquímica de un volumen dado de una solución de la sustancia sometida a ensayo.

Los resultados se expresan en gramos de DBO por gramo de sustancia de prueba.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Es conveniente la utilización de una sustancia de referencia apropiada para verificar la actividad del inóculo.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se siembra con microorganismos y se incuba en la oscuridad a una temperatura ambiente constante dada, una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en un medio apropiado y aireado.

La DBO se determina por la diferencia entre el contenido en oxígeno disuelto al principio y al final del ensayo. La duración mínima del ensayo es de cinco días y la máxima, de 28.

Debe efectuarse un ensayo paralelo en blanco, sin sustancia de ensayo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La determinación de la DBO no puede considerarse como una determinación válida de la biodegradabilidad de la sustancia. Esta prueba solo puede considerarse como prueba exploratoria.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una solución o una dispersión preliminar de la sustancia, con el fin de obtener una concentración de DBO compatible con el método utilizado. La DBO se determina entonces aplicando un método nacional o internacional normalizado que sea apropiado.

▼B

2. **RESULTADOS Y EVALUACIÓN**

La DBO contenida en la solución preliminar se calcula según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DBO por gramo de sustancia de ensayo.

3. **INFORME**

Debe indicarse el método utilizado.

La demanda bioquímica de oxígeno debe ser la media de al menos tres mediciones válidas.

Para facilitar la interpretación de los resultados deben incluirse todos los datos y observaciones que sean pertinentes, especialmente en lo referente a impurezas, estado físico, efectos tóxicos y propiedades específicas de la sustancia que puedan afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se ha utilizado un aditivo inhibidor de la nitrificación biológica.

4. REFERENCIAS

Lista de métodos normalizados, por ejemplo:

NF T 90-103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand

NBN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The Determination of Biochemical Oxygen Demand, Methods for the Examination of Water and Associates Materials, HMSO, Londres.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. DEGRADACIÓN: DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del ensayo es medir la demanda química de oxígeno (DQO) de las sustancias orgánicas, sólidas o líquidas, mediante la aplicación de cualquier procedimiento normalizado, en condiciones de laboratorio determinadas.

Es conveniente disponer de información sobre la fórmula de la sustancia para facilitar la realización del ensayo y la interpretación de los resultados obtenidos (por ejemplo, sales halógenas, sales ferrosas de compuestos orgánicos, compuestos organoclorados).

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La demanda química de oxígeno es la medida de la oxidabilidad de una sustancia, definida como la cantidad equivalente en oxígeno de un reactivo oxidante consumida por la sustancia en condiciones de laboratorio determinadas.

El resultado se expresa en gramos de DQO por gramo de sustancia de ensayo.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es preciso emplear sustancias de referencia cada vez que se analiza una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven, principalmente, para calibrar periódicamente el método y permitir la comparación de resultados cuando se apliquen métodos distintos.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en agua, se oxida con dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico concentrado, con catalizador de sulfato de plata, en caliente y con reflujo durante dos horas. El dicromato residual se valora con ayuda de sulfato ferroso amónico titulado.

En el caso de las sustancias con cloro, se debe añadir sulfato mercúrico (las soluciones que contienen sales de mercurio deben ser tratadas, después de su utilización, pra evitar que pase mercurio al medio ambiente) para atenuar la interferencia de los cloruros.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Dada la arbitrariedad del método de determinación de la DQO, ésta debe considerarse como un «indicador de oxidabilidad» y se utiliza en calidad de tal como método práctico de evaluación de la materia orgánica.

Los cloruros pueden interferir en este ensayo; las sustancias inorgánicas reductoras u oxidantes pueden interferir igualmente con la determinación de la DQO.

Algunos compuestos cíclicos y muchas sustancias volátiles (p.ej., ácidos grasos de cadena corta) no se oxidan totalmente durante el ensayo.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una solución o una dispersión preliminar de la sustancia, para conseguir una DQO de 250 a 600 mg por litro.

▼B

Notas:

Cuando se trata de sustancias poco solubles y que no se dispersan, se puede pesar una cantidad de sustancia finamente pulverizada, o en estado líquido, correspondiente a unos 5 mg de DQO, e introducirla en el aparato experimental añadiendo agua.

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina a menudo mejor, sobre todo en el caso de sustancias poco solubles, con una variante del método, es decir, en un sistema cerrado con ecualizador de presión (H. Kellcenberg, 1975). Con esta modificación puede conseguirse cuantificar sustancias que se determinan con mucha dificultad cuando se usa el método convencional (por ejemplo, ácido acético). Sin embargo, el método falla igualmente en el caso de la piridina. Si se alcanza una concentración de dicromato potásico de 0,25 N (0,0416 M), como se prescribe en la referencia (1), se facilita la adición directa de 5-10 mg de sustancia, lo que resulta esencia] para la determinación de la DQO de las sustancias poco hidrosolubles [referencia (2)].

Por lo demás, la DQO se determina a continuación aplicando cualquier método nacional o internacional normalizado que sea adecuado.

2. **RESULTADOS Y EVALUACIÓN**

Se calcula la DQO contenida en el frasco experimental según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DQO por gramo de sustancia de ensayo.

3. **INFORME**

Debe indicarse el método utilizado.

La demanda química de oxigeno debe ser la media de al menos tres mediciones. Se incluirán iodos los datos y observaciones que puedan facilitai la interpretación de los resultados, especialmente los referentes a impurezas estado físico y propiedades especificas de la sustancia (si se conocen) que puedan afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se na usado sulfato mercurico para reducir la interferencia de los cloturos.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasssrforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradibility testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Lista de métodos normalizados, por ejemplo:

NBN T 91-201 Determination of the Chemical Oxygen Demand

ISBN 0 11 7512494 Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters

NF T 90-101 Determination of the Chemical Demand

DS 217 — Water Determination of the Chemical Oxygen Demand

Analysis

DIN 38409-H-41 Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l

KEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik

ISO 6060 Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods

▼B

C.7. DEGRADACIÓN — DEGRADACIÓN ABIÓTICA: HIDRÓLISIS EN FUNCIÓN DEL pH

1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 111 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias químicas pueden llegar a las aguas superficiales por vías como la aplicación directa, los aerosoles erráticos, la escorrentía, el drenaje, la eliminación de residuos, los efluentes industriales, domésticos o agrícolas y la deposición atmosférica, y pueden transformarse en dichas aguas mediante procesos químicos (por ejemplo, hidrólisis, oxidación), fotoquímicos y microbianos. Las presentes directrices describen un método de ensayo de laboratorio para evaluar la transformación hidrolítica abiótica de sustancias químicas en sistemas acuáticos a valores de pH que se encuentran normalmente en el medio ambiente (pH de 4 a 9) y se basa en otras directrices anteriores [(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)].

Con los experimentos se pretende determinar: i) la velocidad de hidrólisis de la sustancia problema en función del pH, y ii) la identidad o naturaleza y las velocidades de formación y destrucción de los productos de hidrólisis a los que pueden estar expuestos los organismos. Tales estudios pueden ser necesarios en relación con sustancias que se aplican directamente al agua o que pueden llegar al medio ambiente por las otras vías antes citadas.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Véase el anexo 2.

1.3. APLICABILIDAD DEL MÉTODO

El método es aplicable en general a todas las sustancias químicas (tanto marcadas como sin marcar) para las que se disponga de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles y no volátiles que tengan la suficiente hidrosolubilidad. El ensayo no debe aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del agua (por ejemplo, fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en solución en las condiciones experimentales del ensayo. Puede ser difícil efectuar el ensayo con sustancias muy poco hidrosolubles (8).

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se tratan con la sustancia problema soluciones acuosas estériles amortiguadoras con diferentes valores de pH (pH de 4, 7 y 9), y se incuban en la oscuridad en condiciones de laboratorio controladas (a temperaturas constantes). A intervalos determinados, se analiza el contenido de sustancia problema y de productos de su hidrólisis en las soluciones amortiguadoras. Si se utiliza una sustancia problema marcada (por ejemplo, ^{14}C) es más fácil calcular el balance de masa.

Este método de ensayo está diseñado según un enfoque secuencial que se muestra y explica en el anexo 1. A cada etapa de la secuencia se pasa en función de los resultados de la etapa anterior.

▼B

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la velocidad de hidrólisis puede utilizarse una sustancia problema marcada o sin marcar. Generalmente se prefiere utilizar material marcado para estudiar la ruta de la hidrólisis y para establecer el balance de masa; sin embargo, el marcado puede no ser absolutamente necesario en casos especiales. Se recomienda el marcado con ^{14}C, pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como ^{13}C, ^{15}N o ^{3}H. En la medida de lo posible, el marcador debe ubicarse en la parte o partes más estables de la molécula. Por ejemplo, si la sustancia problema contiene un solo anillo, es preciso marcar ese anillo; si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de hidrólisis. La pureza de la sustancia problema debe ser de al menos del 95 %.

Antes de llevar a cabo un ensayo de hidrólisis, debe disponerse de la información siguiente sobre la sustancia problema:

a) hidrosolubilidad (método de ensayo A.6);

b) solubilidad en disolventes orgánicos;

c) presión de vapor (método de ensayo A.4) o constante de la ley de Henry;

d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (método de ensayo A.8);

e) constante de disociación (pK_a) (directrices OCDE 112) (9);

f) velocidad de fototransformación directa e indirecta en agua, en su caso.

Debe disponerse de métodos analíticos de cuantificación de la sustancia problema y, cuando sea pertinente, de identificación y cuantificación de los productos de su hidrólisis en soluciones acuosas (véase también el punto 1.7.2).

1.6. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

A ser posible, deben utilizarse sustancias de referencia para la identificación y cuantificación de los productos de la hidrólisis mediante métodos espectroscópicos y cromatográficos, u otros métodos con la sensibilidad adecuada.

1.7. CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1. **Recuperación**

Mediante el análisis de soluciones amortiguadoras, cuando menos con dos réplicas en paralelo, o de sus extractos inmediatamente después de la adición de la sustancia problema se obtiene una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia problema. Los valores de recuperación correspondientes a etapas posteriores de los experimentos los dan los balances de masa respectivos (cuando se utiliza material marcado). Las tasas de recuperación tienen que oscilar entre el 90 % y el 110 % de las sustancias tanto marcadas como sin marcar (7). En caso de que sea técnicamente difícil llegar a esta banda, puede aceptarse una recuperación del 70 % de sustancias sin marcar, pero debe justificarse la situación.

▼B

1.7.2. **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método o métodos analíticos utilizados para cuantificar la sustancia problema y los productos de hidrólisis posteriormente puede comprobarse mediante análisis de réplicas en paralelo de las mismas soluciones amortiguadoras (o de sus extractos) después de que se hayan formado cantidades de productos de hidrólisis suficientes para su cuantificación.

El método analítico debe tener la sensibilidad suficiente para cuantificar concentraciones de sustancia problema iguales o inferiores al 10 % de la concentración inicial. En su caso, los métodos analíticos deben tener también la suficiente sensibilidad para cuantificar cualquier producto de hidrólisis que represente el 10 % o más de la cantidad aplicada (en cualquier momento a lo largo del estudio) hasta el 25 % o menos de su concentración máxima.

1.7.3. **Intervalos de confianza de los datos cinéticos de la hidrólisis**

Deben calcularse y presentarse los intervalos de confianza de todos los coeficientes de regresión, constantes de velocidad, semividas y cualesquiera otros parámetros cinéticos (por ejemplo, TD50).

1.8. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.8.1. **Equipo y material**

El estudio debe realizarse en recipientes de vidrio (por ejemplo, tubos de ensayo, frascos pequeños) en condiciones estériles y de oscuridad, en caso necesario, salvo que se disponga de información previa (como el coeficiente de reparto n-octanol/agua) que indique la posibilidad de adherencia de la sustancia problema al vidrio. En tal situación, puede ser necesario considerar la utilización de otros materiales (como el teflón). También puede caber la posibilidad de solucionar el problema de la adherencia al vidrio con uno o más de los métodos siguientes:

— determinación de la masa de la sustancia problema y productos de hidrólisis que adsorbe el recipiente de ensayo,

— empleo de un baño de ultrasonidos,

— lavado con disolventes de todo el material de vidrio en cada intervalo de muestreo,

— utilización de productos formulados,

— uso de una cantidad mayor de cosolvente para añadir la sustancia problema al sistema; si se utiliza un cosolvente, éste no debe hidrolizar la sustancia problema.

Normalmente es necesario utilizar agitadores de baños de agua con temperatura controlada o incubadores termostáticos para la incubación de las diversas soluciones problema.

Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— pHmetro;

▼B

— instrumentos analíticos tales como equipos de cromatografía (de gases, de líquidos de alta resolución o de capa fina), incluidos los sistemas de detección adecuados para el análisis de sustancias radiomarcadas y sin marcar o un método inverso de dilución isotópica,

— instrumentos de identificación (por ejemplo, espectrometría de masas, cromatografía de gases con espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc.),

— contador de centelleo de líquidos,

— ampollas de decantación para la extracción líquido-líquido;

— instrumental para concentrar soluciones y extractos (por ejemplo, evaporador rotatorio);

— equipo de control de la temperatura (por ejemplo, baño de agua).

Entre los reactivos químicos figuran, por ejemplo:

— disolventes orgánicos, con grado analítico de pureza, tales como hexano, diclorometano, etc.,

— líquido de centelleo,

— soluciones amortiguadoras (véase el punto 1.8.3).

Debe esterilizarse todo el material de vidrio, así como el agua de grado reactivo y las soluciones amortiguadoras que se utilicen en los ensayos de hidrólisis.

1.8.2. **Aplicación de la sustancia problema**

La sustancia problema debe añadirse como solución acuosa a las diferentes soluciones amortiguadoras (véase el anexo 3). Cuando sea necesario para conseguir una disolución adecuada, se permite utilizar pequeñas cantidades de disolventes miscibles con el agua (como acetonitrilo, acetona o etanol) para la aplicación y distribución de la sustancia problema, pero sin sobrepasar en principio el 1 % v/v. Cuando se desee recurrir a una concentración superior de disolventes (por ejemplo, en caso de sustancias problema poco solubles), esta podría autorizarse solo si se demuestra que el disolvente no afecta a la hidrólisis de la sustancia problema.

No se recomienda en principio el uso de productos formulados, ya que no puede excluirse que los componentes de la formulación influyan sobre el proceso de hidrólisis. Sin embargo, cuando se trate de sustancias problema poco hidrosolubles o que se adhieran al vidrio (véase el punto 1.8.1), puede ser una alternativa adecuada el empleo de material formulado.

Debe utilizarse una sola concentración de la sustancia problema, sin pasar de 0,01 M o de la mitad de la concentración de saturación (véase el anexo 1).

▼B

1.8.3. **Soluciones amortiguadoras**

El ensayo de hidrólisis debe efectuarse a pH de 4, 7 y 9. Para conseguirlo, deben prepararse soluciones amortiguadoras utilizando agua y sustancias de grado reactivo. En el anexo 3 se presentan varios sistemas amortiguadores útiles. Debe observarse que el sistema amortiguador utilizado puede afectar a la velocidad de la hidrólisis; en caso de que sea así, debe emplearse otro sistema amortiguador ([1]).

Debe comprobarse el pH de cada solución amortiguadora con un pHmetro calibrado que tenga una precisión mínima de 0,1 a la temperatura necesaria.

1.8.4. **Condiciones del ensayo**

1.8.4.1. *Temperatura del ensayo*

Los experimentos de hidrólisis deben efectuarse a temperatura constante. A efectos de extrapolación, es importante que la variación máxima de la temperatura sea de ± 0,5 ºC.

Debe realizarse un ensayo preliminar (etapa 1) a la temperatura de 50 ºC si no se conoce el comportamiento hidrolítico de la sustancia problema. Deben efectuarse ensayos cinéticos de etapas superiores con un mínimo de tres temperaturas (incluido el ensayo a 50 ºC), salvo que la sustancia problema sea estable frente a la hidrólisis según el ensayo de la etapa 1. Se sugiere la banda de temperaturas de 10-70 ºC (de preferencia con al menos una temperatura por debajo de 25 ºC), que incluye la temperatura de 25 ºC consignada en el informe y la mayoría de las temperaturas observadas sobre el terreno.

1.8.4.2. *Luz y oxígeno*

Todos los ensayos de hidrólisis deben realizarse siguiendo un método adecuado para evitar efectos fotolíticos. Deben tomarse todas las medidas necesarias para evitar la presencia de oxígeno (por ejemplo, burbujeando helio, nitrógeno o argón durante 5 minutos antes de la preparación de la solución).

1.8.4.3. *Duración del ensayo*

El ensayo preliminar debe efectuarse durante cinco días, mientras que los ensayos de etapas más avanzadas deben mantenerse hasta conseguir la hidrólisis del 90 % de la sustancia problema, o bien durante 30 días si este plazo es más breve.

1.8.5. **Realización del ensayo**

1.8.5.1. *Ensayo preliminar (etapa 1)*

El ensayo preliminar se efectúa a 50 ±0,5 ºC y a un pH de 4,0, 7,0 y 9,0. Si al cabo de cinco días se observa menos del 10 % de hidrólisis ($t_{0,525}$ ºC > 1 año), se considera que la sustancia problema es hidrolíticamente estable y, en principio, no es necesario hacer más ensayos. Si se sabe que la sustancia es inestable a temperaturas pertinentes para el medio ambiente ([2]), no es necesario efectuar el ensayo preliminar. El método analítico debe tener la precisión y sensibilidad suficientes para detectar una reducción del 10 % de la concentración inicial.

([1]) Mabey y Mill recomiendan los amortiguadores de borato o acetato en lugar de los de fosfato (11).

([2]) Esta información puede proceder de fuentes distintas, como datos bibliográficos de la hidrólisis de compuestos similares estructuralmente o mediante otros ensayos preliminares semicuantitativos de hidrólisis de la sustancia problema en una fase anterior del desarrollo.

▼B

1.8.5.2. *Hidrólisis de sustancias inestables (etapa 2)*

El ensayo en etapas superiores debe realizarse a los valores de pH a los que se haya visto que la sustancia problema es inestable según el ensayo preliminar antes citado. Las soluciones amortiguadoras de la sustancia problema deben mantenerse constantemente a las temperaturas seleccionadas. Para hacer un ensayo respecto a una cinética de primer orden, cada solución de reacción debe analizarse a intervalos que proporcionen datos de un mínimo de seis puntos espaciados, normalmente entre el 10 % y el 90 % de hidrólisis de la sustancia problema. Deben tomarse muestras distintas en paralelo (un mínimo de dos réplicas procedentes de recipientes de reacción diferentes) para analizar su contenido en, como mínimo, 6 momentos de muestreo (para tener un mínimo de 12 puntos de datos en paralelo). Se considera inadecuado utilizar una sola solución a granel de la que se van tomando alícuotas individuales de la solución problema tras cada intervalo de muestreo, ya que esto no permite el análisis de la variabilidad de los datos y puede provocar problemas de contaminación de la solución problema. Deben realizarse pruebas de confirmación de la esterilidad al final del ensayo en etapas superiores (es decir, con el 90 % de hidrólisis o a los 30 días). Sin embargo, si no se observa ninguna degradación (es decir, transformación) no es necesario realizar pruebas de esterilidad.

1.8.5.3. *Identificación de los productos de la hidrólisis (etapa 3)*

Con métodos analíticos adecuados, deben identificarse todos los productos importantes de la hidrólisis, al menos los que representen una proporción > 10 % de la dosis aplicada.

1.8.5.4. *Ensayos facultativos*

Puede ser necesario efectuar ensayos complementarios con valores de pH distintos de 4, 7 y 9 en relación con sustancias problema hidrolíticamente inestables. Así, puede ser necesario por motivos fisiológicos efectuar un ensayo en condiciones más ácidas (por ejemplo, a un pH de 1,2) utilizando una única temperatura pertinente a efectos fisiológicos (37 ºC).

2. **DATOS**

Las cantidades de sustancia problema y de productos de su hidrólisis, en su caso, deben indicarse como porcentaje de la concentración inicial aplicada y, cuando corresponda, en mg/l respecto a cada intervalo de muestreo y cada pH y temperatura de ensayo. Además, debe darse un balance de masa en porcentaje de la concentración inicial aplicada cuando se haya utilizado una sustancia problema marcada.

Debe proporcionarse una representación gráfica del logaritmo de la concentración de la sustancia problema frente al tiempo. Deben identificarse todos los productos importantes de la hidrólisis, al menos los que constituyan una proporción > 10 % de la dosis aplicada, y sus concentraciones logarítmicas deben representarse de la misma manera que la sustancia original para mostrar sus velocidades de formación y destrucción.

▼B

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Utilizando cálculos según modelos cinéticos adecuados, deben obtenerse determinaciones más exactas de las semividas o valores de TD_{50}. Se consignarán los valores de semivida y TD_{50} (incluidos los límites de confianza) respecto a cada pH y temperatura, junto con la descripción del modelo utilizado, el orden de la cinética y el coeficiente de determinación (r^2). Si procede, se aplicarán los cálculos asimismo a los productos de la hidrólisis.

Si se trata de estudios de velocidad efectuados a varias temperaturas, las constantes de velocidad de hidrólisis de pseudo-primer orden (k_{obs}) deberán describirse en función de la temperatura. Los cálculos se basarán tanto en la separación de k_{obs} en constantes de velocidad en relación con la hidrólisis catalizada por ácidos, la neutra y la catalizada por bases (kH, kneutral y k_{OH} respectivamente) como en la ecuación de Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

donde A_i y B_i son constantes de regresión de la ordenada en el origen y de la pendiente, respectivamente, de las rectas mejor ajustadas obtenidas por regresión lineal de ln k_i frente a la inversa de la temperatura absoluta en grados Kelvin (T). Mediante el uso de las relaciones de Arrhenius respecto a la hidrólisis catalizada por ácidos, la neutra y la catalizada por bases, es posible calcular constantes de velocidad de pseudo-primer orden y, por tanto, semividas, relativas a otras temperaturas a las que sea difícil efectuar directamente la determinación experimental de una constante de velocidad (10).

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La mayoría de las reacciones de hidrólisis muestran una velocidad de reacción de primer orden aparente y, por lo tanto, las semividas son independientes de la concentración (véase la ecuación 4 del anexo 2). Esto permite normalmente aplicar a condiciones ambientales (concentraciones < 10^{-6} M) los resultados de laboratorio determinados a concentraciones de 10^{-2} a 10^{-3} M (10). Mabey y Mill (11) han presentado varios ejemplos de concordancia entre velocidades de hidrólisis medidas en agua tanto pura como natural respecto a diversas sustancias, con la condición de que se hubieran medido tanto el pH como la temperatura.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador si se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 1.5),

— pureza (impurezas) de la sustancia problema,

— pureza radioquímica de la sustancia marcada y actividad molar (si procede).

▼B

— Soluciones amortiguadoras:

— fechas y datos de su preparación,

— amortiguadores y aguas utilizados,

— molaridad y pH de las soluciones amortiguadoras.

Condiciones de ensayo:

— fechas de realización de los estudios,

— cantidad de la sustancia problema aplicada,

— métodos y disolventes (tipo y cantidad) utilizados para la aplicación de la sustancia problema,

— volumen incubado de las soluciones amortiguadoras con la sustancia problema,

— descripción del sistema de incubación utilizado,

— pH y temperatura durante el estudio,

— tiempos de muestreo,

— métodos de extracción,

— métodos de identificación y cuantificación de la sustancia problema y de los productos de su hidrólisis en las soluciones amortiguadoras,

— número de réplicas en paralelo.

Resultados:

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— tasas de recuperación (en el punto 1.7.1 se dan los porcentajes necesarios para la validez del estudio),

— datos de las réplicas en paralelo y medias en forma tabular,

— balance de masa durante los estudios y al final de estos (si se utilizan sustancias problema marcadas),

— resultados del ensayo preliminar,

— evaluación e interpretación de los resultados,

— todos los datos y figuras originales.

La siguiente información es necesaria solo en caso de que se determine la velocidad de hidrólisis:

— representación gráfica de la concentración frente al tiempo correspondiente a las sustancias problema y, en su caso, a los productos de la hidrólisis a cada valor de pH y temperatura,

— cuadros de resultados de la ecuación de Arrhenius para la temperatura de 20 - 25 ºC, con los valores de pH, constante de velocidad [h^{-1} o $día^{-1}$], semivida o TD_{50}, temperaturas [ºC], incluidos los límites de confianza y coeficientes de correlación (r^2) u otra información comparable,

— ruta propuesta de hidrólisis.

▼B

4. **REFERENCIAS**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Unión Europea (UE) (1995). Directiva 95/36/CE de la Comisión, por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. anexo V: Destino y comportamiento en el medio ambiente.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

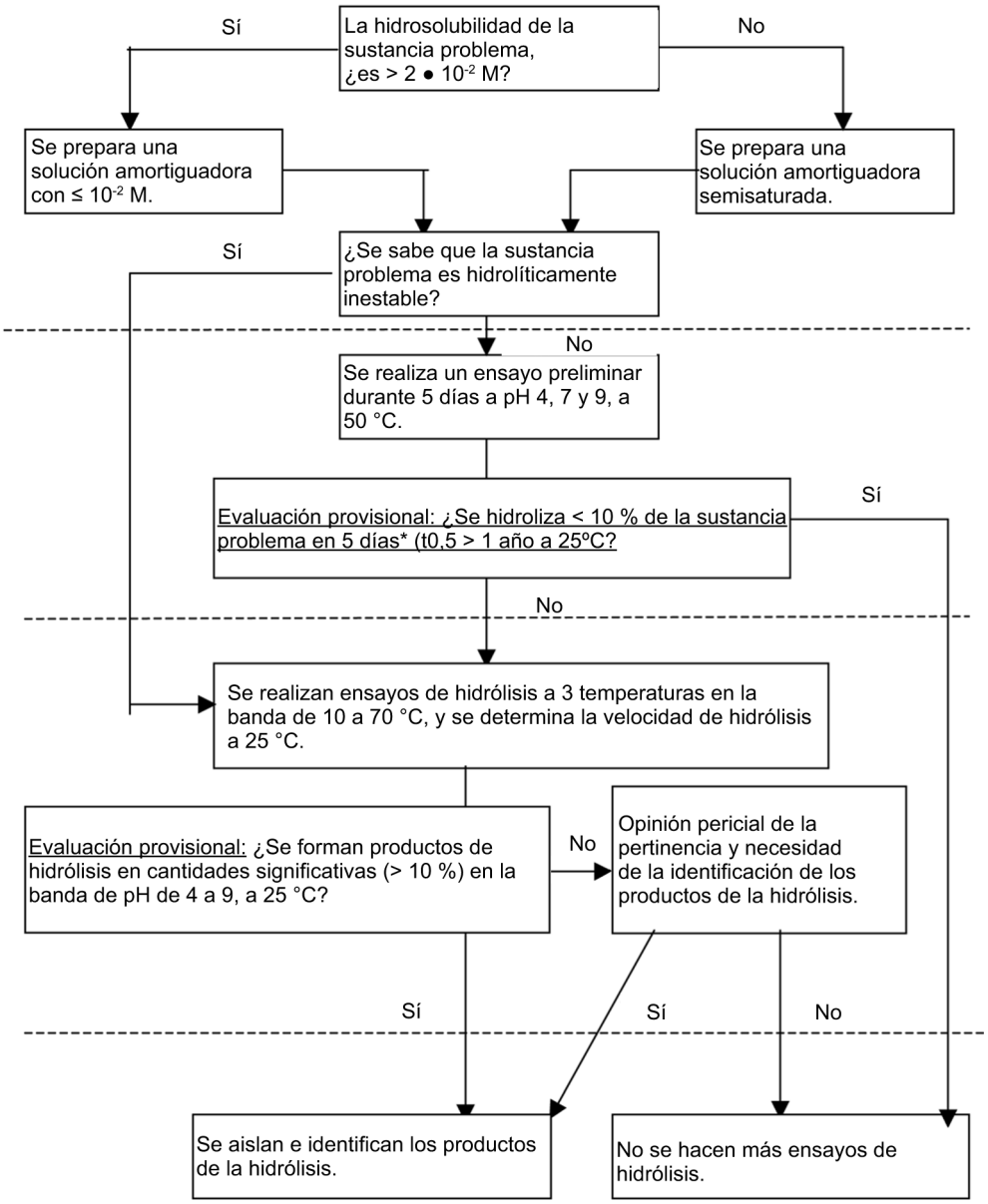
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Anexo 1

Esquema del ensayo de hidrólisis en etapas



* El 10 % de hidrólisis de una sustancia problema a 50 °C equivale a una semivida de 30 días aproximadamente, lo que corresponde a un valor aproximado de un año a 25 ºC.

▼B

Anexo 2

Definiciones y unidades

Siempre deben utilizarse **unidades del Sistema Internacional**.

Sustancia problema: cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

Productos de transformación: todas las sustancias procedentes de reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia problema.

Productos de hidrólisis: todas las sustancias procedentes de reacciones de transformación hidrolítica de la sustancia problema.

Hidrólisis: reacción de una sustancia problema RX con el agua, con la sustitución final del grupo X por el OH en el centro de reacción:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

La velocidad a la que disminuye la concentración de RX en este proceso simplificado viene dada por:

velocidad = $k\ [H_2O]\ [RX]$ reacción de segundo orden

o

velocidad = $k\ [RX]$ reacción de primer orden

según la fase determinante de la velocidad. Como hay un gran exceso de agua respecto a la sustancia problema, este tipo de reacción se suele describir como reacción de pseudo-primer orden, y la constante de velocidad observada viene dada por la fórmula siguiente:

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

and can be determined from the expression (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

donde

t = tiempo

y C_o, C_t = concentraciones de RX a los tiempos 0 y t.

Las unidades de esta constante tienen las dimensiones de $(\text{tiempo})^{-1}$ y la semivida de la reacción (tiempo para que reaccione el 50 % de RX) viene dada por:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Semivida: ($t_{0,5}$) tiempo necesario para la hidrólisis del 50 % de una sustancia problema cuando puede describirse la reacción mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración.

(*) Si la representación gráfica del logaritmo de los datos frente al tiempo no indica una función lineal (identificada con una velocidad de reacción de primer orden), no es apropiado utilizar la ecuación [3] para determinar la constante de la velocidad de hidrólisis de la sustancia problema.

▼B

TD_{50} (tiempo de desaparición 50): tiempo necesario para que la concentración de la sustancia problema se reduzca en un 50 %; es diferente de la semivida ($t_{0,5}$) si la reacción no sigue una cinética de primer orden.

Estimación de k a temperatura diferente

Si se conocen las constantes de velocidad correspondientes a dos temperaturas, pueden calcularse las constantes de velocidad a otras temperaturas utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ o } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

La representación gráfica de ln k frente a l/T es una línea recta con una pendiente de -E/R

donde:

k = constante de velocidad, medida a temperaturas diferentes

E = energía de activación [kJ/mol]

T = temperatura absoluta [K]

R = R = constante de los gases [8,314 J/mol.K].

La energía de activación se calcula por análisis de regresión o con la siguiente ecuación:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

donde: $T_2 > T_1$.

▼B

Anexo 3

Sistemas amortiguadores

A. **CLARK Y LUBS:**

Mezclas amortiguadoras de CLARK y LUBS (*)

Composición	pH
HCl 0,2 N y KCl 0,2 N a 20 ºC	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml	2,2
Biftalato potásico 0,1 M + HCl 0,1 N a 20 ºC	
46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	2,2
39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	2,4
32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	2,6
26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	2,8
20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	3,0
14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	3,2
9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	3,4
5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	3,6
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	3,8
Biftalato potásico 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 ºC	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	4,2
7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	4,4
12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	4,6
17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	4,8

(*) Los valores de pH indicados en estos cuadros se han calculado a partir de mediciones del potencial utilizando las ecuaciones tipo de Sörensen (1909). Los valores correspondientes de pH son 0,04 unidades superiores a los valores de los cuadros.

▼B

Composición	pH
23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	5,0
29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	5,2
35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	5,4
39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	5,6
43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	5,8
45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml	6,0

Mezclas amortiguadoras de CLARK y LUBS (continuación)

Fosfato monopotásico 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 ºC	
5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	6,0
8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	6,2
12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	6,4
17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	6,6
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	7,2
39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	7,4
42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	7,6
45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	7,8
46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml	8,0
H_3BO_3 0,1 M en KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 ºC	
2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	7,8
3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	8,0
5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	8,2
8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	8,4
12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	8,6
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	9,4
36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	9,6
40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	9,8
43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF Y VLEESCHHOUWER:**

Amortiguadores de citrato de KOLTHOFF y VLEESCHHOUWER

Composición	pH
Citrato monopotásico 0,1 M y HCl 0,1 N a 18 ºC (*)	
49,7 ml. HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	2,2
43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	2,4
36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	2,6
30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	2,8
23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	3,0
17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	3,2
10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	3,4
4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	3,6
Citrato monopotásico 0,1 M y NaOH 0,1 N a 18 ºC (*)	
2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	4,2
23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	4,4
31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	4,6
39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	4,8
46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	5,0
54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	5,2
61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	5,4
68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	5,6
74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	5,8
81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml	6,0

(*) Se añaden pequeños cristales de timol u otra sustancia similar para evitar el crecimiento de mohos.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Mezclas de borato de SÖRENSEN

Composición		Sörensen 18 ºC	Walbum, pH a		
ml de bórax	ml HCl/NaOH		10 ºC	40 ºC	70 ºC
Bórax 0,05 M + HCl 0,1 N					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
Bórax 0,05 M + NaOH 0,1 N					
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
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Mezclas de fosfato de SÖRENSEN

Composición	pH
Fosfato monopotásico 0,0667 M + fosfato disódico 0,0667 M a 20 ºC	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 **TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA-ENSAYO**

CON SUELO ARTIFICIAL

1. **MÉTODO.**

1.1. INTRODUCCIÓN

En este ensayo de laboratorio, la sustancia con la que se va a experimentar se añade a un suelo artificial en el que se colocan gusanos durante 14 días, Después de este período (que, opcionalmente, puede ser de 7 días) se examina el efecto letal de la sustancia sobre los gusanos. Este ensayo provee un método que permite investigar, a relativamente corto plazo, los efectos causados por sustancias químicas sobre los gusanos, por absorción oral o cutánea.

1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

CL_{50}: Concentración de una sustancia que se considera la causante de la muerte del 50 % de los animales investigados durante el período de ensayo.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Se utiliza periódicamente una sustancia de referencia como medio para demostrar que la sensibilidad del sistema de ensayo no ha cambiado de manera significativa.

Se recomienda que esta sustancia sea la cloroacetamida de grado analítico.

1.4. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Por ser el suelo un medio variable, para este ensayo se utiliza marga artificial definida cuidadosamente. Los gusanos adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota del anexo) se mantienen en una tierra artificial que se trata con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo. El contenido de los recipientes se extiende sobre una bandeja a los 14 días (opcionalmente, pueden ser 7) del comienzo del ensayo y se cuenten los gusanos supervivientes para cada concentración.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

El ensayo se proyecta de forma que sea lo más reproducible posible con respecto al sustrato y al organismo de ensayo. La mortalidad en los controles no debe exceder del 10 % al final del ensayo, o de lo contrario este no es válido.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. *Materiales*

1.6.1.1. Sustrato de ensayo

Como sustrato básico de ensayo usa un suelo artificial definido.

a) Sustrato básico (los porcentajes se expresan en términos de peso en seco:

— 10 % de turba esfágnea (con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0, sin restos visibles de plantas y finamente molida),

▼B

— 20 % de arcilla de caolinita, preferiblemente con más de un 50 % de caolinita

— alrededor del 69 % de arena de cuarzo industrial (predominando la arena fina, en la que más del 50 % de sus partículas sean de un tamaño de 0,05 a 0,2 mm). Si la sustancia no es lo suficientemente dispersable en agua, se deberán mantener disponibles 10 g por cada recipiente de ensayo para mezclarlos con la sustancia de ensayo más adelante,

— alrededor de un 1 % de carbonato calcico (CO_2Ca), pulverizado y químicamente puro, que se añade con el fin de que el valor del pH sea de 6,0 ± 0,5.

b) Sustrato de ensayo:

El sustrato de ensayo contiene el sustrato básico, la sustancia de ensayo y agua desionizada.

El contenido de agua oscila entre el 25 y el 42 % del peso en seco del sustrato básico. El contenido de agua de un sustrato se determina secando una muestra a una temperatura de 105 ºC, hasta alcanzar un peso constante. El criterio clave consiste en humedecer la tierra artificial hasta un punto en que no quede agua estancada. Se debe tener cuidado al hacer la mezcla, de manera que se obtenga una distribución uniforme de la sustancia de ensayo y del sustrato. Deberá registrarse la manera en que se introduce la sustancia de ensayo en el sustrato.

c) Sustrato de control:

El sustrato de control contiene el sustrato básico y agua. Si se usa un agente aditivo, el sustrato de control adicional debe contener la misma cantidad de agente aditivo.

1.6.1.2. Recipientes de ensayo

Se utilizan recipientes de cristal (cubiertos adecuadamente con membranas, tapaderas o película de plástico con agujeros de ventilación) aproximadamente de un litro de capacidad y llenos de una cantidad de sustrato de ensayo húmedo o de control que sea equivalente a un peso en seco de 500 g de sustrato.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

Los recipientes se deberán mantener en cámaras climatizadas, a una temperatura de 20 (± 2)º C, con luz continua. La intensidad de la luz será de 400 a 800 lux.

El período de ensayo dura 14 días, aunque, opcíonalmente, se puede evaluar la mortalidad a los 7 días del comienzo del ensayo.

1.6.3. *Procedimiento de ensayo*

Concentraciones del ensayo

Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso de sustancia por peso en seco de sustrato básico (mg/kg).

Ensayo para determinar la gama de concentraciones

Por medio de este ensayo se determina la gama de concentraciones que ocasiona porcentajes de mortalidad de 0 a 100; con esta información se establece la gama de concentraciones que se vaya a utilizar en el ensayo definitivo.

▼B

La sustancia se estudiará a las siguientes concentraciones: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de sustancia/kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

Cuando vaya a realizarse un ensayo definitivo, bastará con un lote de ensayo para cada concentración y otro para el sustrato de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos, para llevar a cabo el ensayo de determinación de la gama de concentraciones.

Ensayo definitivo

Los resultados del ensayo para determinar la gama de concentraciones se usan para elegir cinco concentraciones como mínimo, en serie geométrica, que abarquen la gama de mortalidad del cero al 100 % y que difieran entre sí en un factor constante que no exceda de 1,8.

En los ensayos en que se utilice esta serie de concentraciones se estimará el valor de CL_{50} y de sus límites de confianza de la manera más precisa posible.

En el ensayo definitivo se utilizan, como mínimo, cuatro lotes de ensayo por concentración y cuatro sustratos de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos. Los resultados de estos lotes reproducidos son la media y la desviación típica.

Cuando de dos concentraciones consecutivas, en una proporción de 1,8, solo se obtienen los porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL_{50}.

Mezcla del sustrato de ensayo básico y de la sustancia de ensayo

Siempre que sea posible, el sustrato de ensayo no deberá estar compuesto de ningún otro agente adicional que no sea agua. Inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se mezcla una emulsión o dispersión de la sustancia de ensayo en agua desionizada disolvente con el sustrato de ensayo básico, o se rocía dicha emulsión sobre éste de manera uniforme con un rociador cromatográfico fino o con un aparato similar.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo).

Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia de ensayo solo pueden utilizarse los agentes que se volatilizan rápidamente. El sustrato de ensayo debe ser ventilado antes de usarlo. Se repondrá la cantidad de agua evaporada. El sustrato de control deberá contener la misma cantidad de agente aditivo.

Si la sustancia de ensayo no fuese soluble, dispersable o emulsionable en disolventes orgánicos, se mezclarán 10 g de una mezcla de arena de cuarzo finamente molido y la cantidad necesaria de sustancia de ensayo para tratar 500 g (peso en seco) de suelo artificial, con 490 g (peso en seco) de sustrato de ensayo.

Por cada lote de ensayo, se coloca en cada recipiente de cristal una cantidad de sustrato de ensayo húmedo equivalente a 500 g de peso en seco, y en la superficie del mismo se colocan diez gusanos, que han sido acondicionados durante 24 horas en un sustrato básico húmedo similar y a los que, después de lavarlos rápidamente, se les ha extraído el exceso de agua con papel de filtro antes de usarlos.

▼B

Los recipientes se cubren con tapas de plástico perforado, platos o película para evitar el secado del sustrato, y se guardan bajo las condiciones de ensayo durante 14 días.

Se evaluarán los resultados después de 14 días (u opcionalmente, después de 7 días) del comienzo del ensayo. El sustrato se extiende en una placa de vidrio o de acero inoxidable. Se examinan los gusanos y se determina el número de supervivientes. Los gusanos te consideran muertos si no responden a un suave estímulo mecánico en la parte frontal de su cuerpo.

Cuando el examen se efectúa a los 7 días, el recipiente se vuelve a llenar con el sustrato y los gusanos supervivientes se colocan otra vez en la superficie del mismo.

1.6.4. *Organismos de ensayo*

Los organismos de ensayo deberán ser adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota en el anexo) (como mínimo con dos meses de edad y con clitelo) y de un peso húmedo de 300 a 600 mg (véase el anexo para el método de reproducción).

2. DATOS

2.1. TRATAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las concentraciones de la sustancia ensayada se registran con referencia a los porcentajes correspondientes de gusanos de tierra muertos.

Cuando los datos son adecuados, el valor de CL_{50} y los límites de fiabilidad($p = 0,05$) se determinan por medio de métodos estándar (como el de Litchfield y Wilcoxon, 1949, o un método equivalente). El valor de CL_{50} debe ser expresado en mg de sustancia de ensayo por kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

En los casos en que la pendiente de la curva de concentración es tan pronunciada que no puede calcularse el valor de CL_{50}, se considera suficiente una estimación gráfica de este valor.

Cuando de dos concentraciones consecutivas en una proporción de 1,8 solo se obtienen porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL_{50}.

3. INFORMES

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con los criterios de calidad mencionados anteriormente,

— tipo de ensayo efectuado (ensayo de determinación de la gama de concentraciones y/o ensayo definitivo),

— descripción exacta de las condiciones del ensayo o declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con el método; se informará de cualesquiera diferencias con respecto a dicho método,

— descripción exacta de la manera en que se ha mezclado la sustancia de ensayo con el sustrato de ensayo básico,

— información acerca de los organismos de ensayo (especie, edad, peso medio y gama de variación, condiciones relativas a reproducción y cría, abastecedor),

▼B

— método usado en la determinación del valor de $CL_{50,}$

— resultados del ensayo, incluidos todos los datos utilizados,

— descripción de los síntomas o de los cambios en el comportamiento de los organismos de ensayo que se hayan observado,

— mortalidad en los sustratos de control,

— valor de CL_{50} o la máxima concentración con mortalidad y la mínima con una mortalidad del 100 %, después de 14 días (y opcionalmente después de siete días) del comienzo del ensayo,

— trazado de la curva de concentración — respuesta,

— resultados obtenidos con la sustancia de referencia, ya sea en relación con el ensayo actual o con ejercicios previos de control de calidad.

4. **REFERENCIAS**

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas* 207. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) Edwards, D. A. and Lofty, J. R., 1977. *Biology of Earthworms.* London: Chapman and Hall, 331 pp.

(3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique.* Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. A simpliefied method of evaluating dose-effect experiments.J. *Pharm. Exp. Therap., 96,* 99-113.

(5) CEE 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxictty of chemical substances to earthworms.* Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrens vorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisern a foetid a in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Apéndice

Reproducción y cría de los gusanos con anterioridad at ensayo

A fines de reproducción, se colocan en una caja de cría con sustrato fresco de 30 a 50 gusanos adultos, y se sacan después de 14 días. Estos animales se pueden utilizar para lotes de reproducción adicionales. Los gusanos nacidos de los capullos se utilizan en los ensayos una vez que han alcanzado la madurez (según las condiciones prescritas, después de 2 a 4 meses).

Condiciones de reproducción y cría

Cámara climatizada:	a una temperatura de 20 (± 2)º C, preferiblemente con luz continua (intensidad de 400 a 800 lux).
Cajas de reproducción:	recipientes poco profundos apropiados, con un volumen de 10 a 20 litros.
Sustrato:	*Eisenia foetida:* Se puede criar en los excrementos de varios animales. Como medio de crianza se recomienda utilizar una mezcla con un 50 % en volumen de turba y el otro 50 % de excrementos de vaca o caballo. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato cálcico) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mmhos o una concentración de sal del 0,5 %).
	El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado.
	Además del método expuesto anteriormente, se pueden utilizar otros procedimientos con éxito.

Nota: Existen dos razas de *Eisenia foetida,* que algunos taxonomistas han subdividido en especies (Bouche, 1972). Estas dos razas son morfológicamente similares, aunque una de ellas, la *Eisenia foetida foetida,* exhibe rayas o bandas transversales típicas en los segmentos, mientras que a la otra, la *Eisenia foetida andrei,* de color rojizo jaspeado, le faltan. Siempre que sea posible se utilizará la *Eisenia foetida andrei.* Se pueden utilizar otras especies, siempre que se disponga de la metodología necesaria.

▼B

C.9. **BIODEGRADACIÓN**

PRUEBA ZAHNWELLENS

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este método es la evaluación de la máxima degradación potencial de sustancias orgánicas solubles en agua y no volátiles, cuando se encuentran expuestas a concentraciones relativamente elevadas de microorganismos en un ensayo estático.

Puede producirse una absorción físico-química sobre los sólidos en suspensión y esto hay que tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los resultados (véase el punto 3.2).

Las sustancias que vayan a estudiarse serán utilizadas en concentraciones equivalentes a valores de COD entre los 50 y 400 mg/litro o valores de DQO entre los 100 y 1 000 mg/litro(COD = carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxígeno). Estas concentraciones relativamente elevadas tienen la ventaja de ser analíticamente fiables. Los compuestos con propiedades tóxicas pueden retardar o inhibir el proceso de degradación.

En este método, la medida de la concentración de carbón orgánico disuelto, o la demanda de oxígeno químico, se utiliza para calcular la biodegradación máxima de la sustancia objeto del ensayo.

La utilización simultánea de un método analítico específico puede permitir calcular la biodegradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

Este método es aplicable solamente a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

— sean solubles en agua en las condiciones del ensayo,

— tengan una presión de vapor insignificante en las condiciones del ensayo,

— no provoquen inhibición en las bacterias,

— sean absorbidas dentro del sistema del ensayo solo hasta un cierto punto limitado,

— no se pierdan a causa de la formación de espuma a partir de la. solución del ensayo.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material del ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

▼B

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La cantidad de degradación alcanzada al final del ensayo se presenta como la biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_V)}{(C_D - C_{VD})}\right] \times 100$$

donde:

D_T = biodegradación (%) en el tiempo T

C_D = valores de COD (o DQO) en la mezcla del ensayo medidos tres horas después del comienzo del mismo (mg/l) (COD = Carbón orgánico disueleo; DQO = demanda química de oxígeno)

C_T = valores de COD o DQO e la mezcla del ensayo en el momento en que se toma la muestra (mg/l)

C_V = valores de COD o DQO del blanco en el momento de la toma de la muestra (mg/l)

C_{Vd} = valores de COD y DQO en el blanco, medidos 3 horas después del comienzo de la prueba (mg/l).

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana.

El porcentaje de degradación se expresa como el porcentaje de supresión de COD (o DQO) de la sustancia objeto del ensayo.

La diferencia entre los valores medidos tras 3 horas y el valor inical calculado, o preferiblemente medido, puede proporcionar una información útil sobre la eliminación de la sustancia (véase el punto 3.2, «Interpretación de los resultados»).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

En algunos casos, cuando se están investigando sustancias nuevas, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no se pueden recomendar sustancias de referencia específicas.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se ponen juntos, en un recipiente de vidrio de 1 a 4 litros de capacidad y equipado con un mezclador y un aireador, lodo activado, nutrientes minerales y et material del ensayo como única fuente de carbón en solución acuosa. Se remueve y se airea la mezcla a 20-25 ºC, bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro por un período de hasta 28 días. El proceso de degradación se controla por medio de la determinación de los valores de COD (o DQO) en la solución filtrada a intervalos diarios o a intervalos regulares que resulten apropiados. La relación entre la cantidad de COD (DQO) eliminada tras cada intervalo y el valor 3 horas después del comienzo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradación y sirve de medida del alcance de la degradación en ese momento. El resultado se indica en un gráfico en función del tiempo para obtener así la curva de biodegradación.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria),

▼B

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ha quedado demostrado que la reproducibilidad de esta prueba es satisfactoria en una prueba en varios centros.

La sensibilidad de este método viene determinada en gran medida por la variabilidad del blanco y, en menor medida, por la precisión de la determinación del carbón orgánico disuelto y el nivel del compuesto del ensayo en Ja mezcla liquida.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.6.1. *Preparativos*

1.6.1.1. Reactivos

Agua de ensayo: agua potable con un cotenido de carbón orgánico menor de 5 mg/l. La concentración de iones de calcio y magnesio juntos no puede exceder los 2,7 mmoles/l; de otra manera, es necesaria una dilución suficiente con agua desionizada o destilada.

Ácido sulfúrico, reactivo analítico (R.A.):	50 g/l
Solución de hidróxído de sodio R.A.:	40 g/l
Solución de nutriente mineral: disuélvase en un litro de agua desionizada:	
cloruro de amonio, NH_4Cl, R.A.:	38,5 g
dihidrógeno fosfato de sodio, NaH_2PO_4,. $2H_2O$, R.A.:	33,4 g
dihidrógeno fosfato de potasio, KH_2PO_4, R.A.:	8,5 g
monohidrógeno fosfato de dipotasio, K_2HPO_4, R.A.:	21,75 g.

La mezcla sirve a la vez de elemento nutritivo y de sistema tampón.

1.6.1.2. Aparatos

Recipientes de vidrio de un volumen de 1 a 4 litros (por ejemplo, recipientes cilindricos).

Mezclador con un agitador de vidrio o metal colocado en un eje apropiado. (El agitador debe girar a 5-10 cm por encima del fondo del recipiente). Se puede utilizar en su lugar un agitador magnético con una varilla de 7-10 cm de larga.

Un tubo de vidrio de 2 a 4 mm de diámetro interior para introducir aire. La abertura del tubo debe estar a, más o menos, 1 cm por encima del fondo del recipiente.

Una centrífuga (unos 3 550 g).

Un medidor de pH.

Un medidor de oxígeno disuelto.

Filtros de papel.

▼B

Un aparato de filtración por membrana.

Filtros de membrana, tamaño de los poros 0,45 um. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración.

Un equipo analítico para determinar el contenido de carbón orgánico y la demanda química de oxígeno.

1.6.1.3. Preparación del inóculo

Se lava (repetidamente) el lodo activado recogido en una planta de tratamiento biológico, centrifugándolo o dejándolo sedimentarse con agua de iguales características a la que se usa para el ensayo (antes citado).

El lodo activado tiene que estar en condiciones adecuadas. Este fango puede encontrarse en una planta depuradora de aguas residuales que funcione debidamente. Para coger tantas especies o cepas de bacterias diferentes como sea posible, puede ser preferible mezclar inóculos de diferentes fuentes (por ejemplo, diferentes plantas depuradoras, extractos de suelos, aguas de río, etc.). La mezcla debe ser tratada como se describe anteriormente.

Para comprobar la actividad del lodo activado, véase «Control funcional».

1.6.1.4. Preparación de las soluciones del ensayo

Pónganse, en el recipiente que se utiliza para el ensayo, 500 ml de agua de ensayo, 2,5 ml/l de una solución de nutrientes minerales y lodo activado en una cantidad equivalente a 0,2 a 1,0 g/l de materia seca en la mezcla final. Añádase suficiente solución madre de la sustancia a ensayar como para que en la mezcla final se obtenga una concentración de COD de 50 a 400 mg/l. Los valores correspondientes de DQO son 100-1 000 mg/l. Añádase agua de ensayo hasta llegar a un volumen total de 1 a 4 litros. El volumen toral que se elija dependerá del número de muestras que se vayan a tomar para las determinaciones del COD y DQO y las cantidades necesarias para el procedimiento analítico.

Normalmente, puede considerarse satisfactorio un volumen de 2 litros. Se dispone por lo menos un recipiente de control (blanco), paralelamente a cada una de las series de ensayo, que contenga tan solo una solución de lodo activado y la solución de nutrientes minerales, que se completará con agua de ensayo hasta alcanzar un volumen total igual al de los recipientes de ensayo.

1.6.2. *Realización del ensayo*

Se agitan los recipientes del ensayo con agitadores magnéticos o hélices bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro a 20-25º C. La aireación se efectúa con aire comprimido limpiado por medio de un filtro de algodón y lana y un frasco lavador si fuera necesario. Hay que asegurarse de que el lodo no sedimenta y de que la concentración de oxígeno no cae por debajo de los 2 mg/l.

Hay que controlar el pH a intervalos regulares (por ejemplo, cada día) y, si fuera necesario, corregirlo ajustándolo a 7-8.

▼B

Las pérdidas por evaporación se compensan, justo antes de tomar cada muestra, con agua desionizada o destilada en las cantidades necesarias. Un buen procedimiento es marcar el nivel del líquido sobre el recipiente antes de iniciar el ensayo. Se harán marcas nuevas después de cada toma (sin aireación y sín remover). Las primeras muestras se toman siempre 3 horas después del comienzo del ensayo, para detectar la absorción del material de ensayó por parte del lodo activado.

La eliminación del material de ensayo se controla por medio de las determinaciones de COD y DQO hechas diariamente o a intervalos regulares. Las muestras del recipiente utilizado para el ensayo y del recipiente de control son filtradas con un filtro de papel cuidadosamente lavado. Se desechan los primeros 5 ml de la solución filtrada. Los lodos difíciles de filtrar pueden ser separados previamente centrifugándolos durante 10 minutos. Las determinaciones de COD y DQO deben hacerse por lo menos por duplicado. El ensayo se lleva a cabo durante un período de hasta 28 días.

Nota: Las muestras que todavía estén turbias son filtradas con filtros de membrana. Los filtros de membrana no han de desprender ni absorber material orgánico alguno.

Control funcional del lodo activado

En un recipiente que contenga una sustancia conocida deben llevarse a cabo paralelamente cada serie de pruebas, con vistas a controlar la capacidad funcional del lodo activado. Se ha comprobado que el dietilcnoglicol es de utilidad para este propósito.

Adaptación

Si los análisis se llevan a cabo a intervalos relativamente cortos (por ejemplo, diariamente), se puede reconocer claramente la adaptación por medio de la curva de degradación (véase la figura 2). Así pues, el ensayo no debe iniciarse justo antes del fin de semana.

Si la adaptación tiene lugar al final del período, el ensayo puede prolongarse hasta que finalice la degradación.

Nota: Si fuera necesario un conocimiento más amplio del comportamiento del lodo adaptado, se expone de nuevo el mismo lodo activado al mismo material del ensayo, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Desconéctense el agitador y el aireador y permítase que el lodo activado se sedimente. Vacíese el líquido sobrenadante, añádase agua de ensayo hasta alcanzar los 2 litros, agítese durante 15 minutos y déjese sedimentar de nuevo. Después de haber vaciado de nuevo el líquido sobrenadante, utilícese el lodo que queda para repetir el ensayo con el mismo material, de acuerdo con los puntos 1.6.1.4 y 1.6.2. Se puede aislar el lodo activado centrifugando en vez de dejándolo sedimentar.

El lodo adaptado puede mezclarse con lodo fresco hasta alcanzar un total de 0,2 a 1 g de peso en seco, por litro.

▼B

Medios analíticos

Normalmente, se filtran las muestras con un filtro de papel cuidadosamente lavado (para lavarlo, utilícese agua desionizada).

Las muestras que sigan estando turbias se filtrarán con filtros de membrana (0,45 μm).

La concentración de COD se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado (se desechan los primeros 5 ml) por medio del instrumento TOC. Si el líquido filtrado no puede ser analizado el mismo día, tiene que almacenarse en el refrigerador hasta el día siguiente. No se recomienda un almacenaje más prolongado.

La concentración de DQO se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado con un sistema analítico siguiendo el procedimiento descrito en la referencia (2) posterior.

2. DATOS Y EVALUACIÓN

Las concentraciones de COD y DQO se determinan en las muestras, por lo menos por duplicado, de acuerdo con el punto 1.6.2. La degradación en el tiempo T se calcula según la fórmula (con definiciones) dada en el punto 1.2.

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana. La cantidad de degradación lograda al final del ensayo se presenta como la «biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens».

Nota: Si se logra una degradación completa antes de que termine el período de duración del ensayo y si este resultado es confirmado por un segundo análisis al día siguiente, el ensayo puede darse por concluido.

3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

3.1. INFORME SOBRE EL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— la concentración inicial de la sustancia,

— cualquier otra información y los resultados experimentales relativos a la sustancia objeto del ensayo, a la sustancia de referencia, si se utiliza alguna, y al control,

— la concentración después de tres horas,

— la curva de biodegradación con una descripción,

— fecha y lugar en que se tomaron las muestras de los organismos utilizados en el ensayo, status de adaptación, concentración utilizada, etc.,

— causas científicas de cualquier cambio en el procedimiento del ensayo.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La eliminación de COD (o DQO) que tiene lugar gradualmente, durante días o semanas, indica que la sustancia objeto del ensayo se está biodegradando.

▼B

No obstante, la absorción físico-química puede, en algunos casos, desempeñar un papel, y esto se pone de manifiesto cuando hay una eliminación completa o parcial desde el principio, dentro de las tres primeras horas, y la diferencia entre las mezclas líquidas sobrenadantes del control y del ensayo se mantienen a un nivel inesperadamente bajo.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una diferencia entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero lo más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de base fija (una prueba respirométrica preferentemente).

Las sustancias que en este ensayo den una eliminación de COD (o DQO) alta, y no debida a la absorción, deben ser consideradas como potencialmente biodegradables. Una eliminación parcial y no debida a la absorción indica que el producto químico puede sufrir al menos cierta biodegradación. Una eliminación baja o nula de COD (o DQO) puede deberse a que la sustancia objeto del ensayo provoca la inhibición de los microorganismos. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida del lodo, produciendo sobrenadantes turbios. Se debe repetir el ensayo utilizando una concentración inferior de la sustancia objeto de estudio.

La utilización de un método analítico específico para el compuesto, o de una sustancia del ensayo marcada con ^{14}C, puede permitir una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de ensayo marcado con ^{14}C la obtención de $^{14}CO_2$ confirmará que se ha producido biódegradación.

Cuando los resultados se presenten en términos de biodegradación primaria, se debe dar, si fuera posible, una explicación sobre el cambio de estructura química que lleva a la pérdida de respuesta de la sustancia madre utilizada en el ensayo.

La validación del método analítico tiene que presentarse junto con la respuesta encontrada con el medio de ensayo control (blanco).

REFERENCIAS

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas* 302 B. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) anexo V C.9 Degradación: Demanda química de oxígeno, Directiva 84/449/CEE de la Comisión, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* Nº L 251 de 19.9.1984.

▼B

Anexo

EJEMPLO DE EVALUACIÓN

Compuesto orgánico:	Ácido 4-Etoxibenzoico
Concentración teórica de ensayo:	600 mg/l
COD teórico:	390 mg/l
inóculo:	Planta depuradora de aguas residuales . . .
Concentración:	1 g de material seco/litro
Status de adaptación:	No adaptado
Análisis:	Determinación de COD
Cantidad de muestra:	3 ml
Sustancia de control:	Dietilenglicol
Toxicidad del compuesta:	Sin efectos tóxicos por debajo de los 1 000 mg/l. Ensayo utilizado: Ensayo de fermentación con tubos.

Tiempo de ensayo	Sustancia de control				Sustancia de ensayo		
	COD (1) del control mg/l	COD (1) mg/l	COD neto mg/l	Degradación %	COD (1) mg/l	COD neto mg/l	Degradación (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	_
3h	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 d	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2d	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 d	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6d	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7d	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 d	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 d	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 d	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valores medios de determinaciones por triplicado.

▼B

Figura 1

Ejemplos de curvas de biodegradación

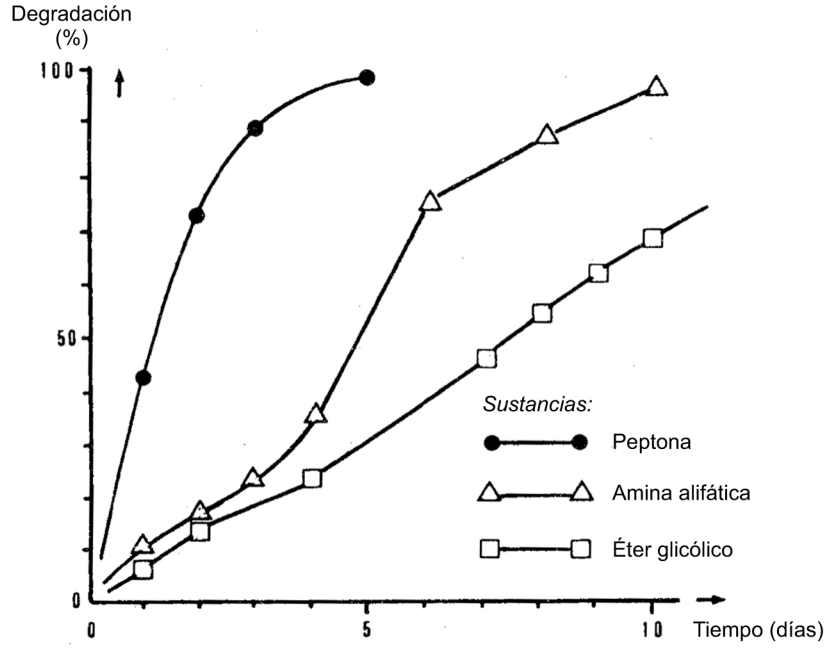
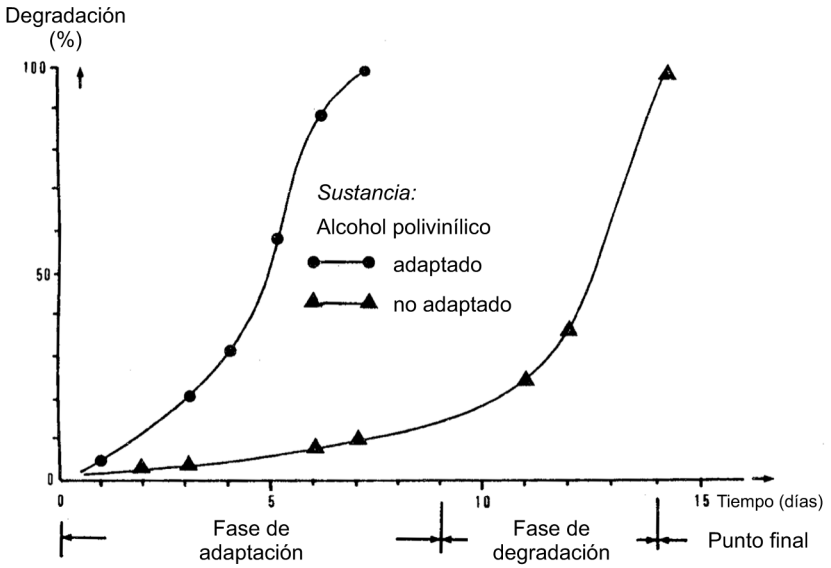


Figura 2

Ejemplos de adaptación del lodo



▼M4

C.10. **PRUEBA DE SIMULACIÓN DE TRATAMIENTO AERÓBICO DE AGUAS RESIDUALES: C.10-A: UNIDADES DE LODO ACTIVADO — C.10-B: BIOPELÍCULAS**

C.10-A: Unidades de lodo activado

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 303 (2001). En la década de 1950 se observó que los agentes tensioactivos de reciente introducción provocaban la formación excesiva de espuma en las depuradoras de aguas residuales y en los ríos. El tratamiento aeróbico no era suficiente para eliminarlos totalmente y en algunos casos limitaban la eliminación de otros tipos de materia orgánica. Esta situación dio pie a que se pusieran en marcha muchas investigaciones sobre cómo eliminar los agentes tensioactivos de las aguas residuales y sobre si las nuevas sustancias producidas por la industria podían someterse al tratamiento de las aguas residuales. Con este objetivo, se utilizaron unidades modelo que representaban a los dos tipos principales de tratamiento biológico aeróbico de las aguas residuales (lodo activado y filtración por percolación o por goteo). Habría sido poco práctico y muy caro distribuir cada sustancia nueva y controlar las grandes depuradoras, incluso de forma local.

CONSIDERACIONES INICIALES

Unidades de lodo activado

2. Se han descrito unidades modelo de lodo activado en una gama de 300 a unos 2 000 ml. Algunas simulaban muy bien las condiciones de las instalaciones de escala real, y disponían de tanques de sedimento de lodo en los que el lodo sedimentado se bombeaba de nuevo al tanque de aireación, mientras que otras no tenían dispositivos de sedimentación como, por ejemplo, Swisher (1). El tamaño del aparato representa un compromiso: por una parte, debe ser suficientemente grande para un funcionamiento mecánico adecuado y para permitir la toma de un volumen suficiente de muestras sin que el funcionamiento se vea afectado, pero, por otra parte, no debe ser tan grande que sus necesidades de espacio y de materiales sean excesivas.

3. Dos formas de aparatos que se han utilizado ampliamente y dando satisfacción son las unidades Husmann (2) y las unidades de depósito poroso (3) (4), que son las utilizadas en primer lugar en el estudio de tensioactivos; estas se describen en el presente método de ensayo. Hay otros tipos que también se han utilizado con éxito, como el de Eckenfelder (5). Debido a que son relativamente elevados el coste y el esfuerzo necesarios para aplicar esta prueba de simulación, se han investigado en paralelo otros ensayos exploratorios más simples y baratos, recogidos ahora en el capítulo C.4-A a F del presente anexo (6). La experiencia con muchos tensioactivos y otras sustancias ha puesto de manifiesto que los que pasaban los ensayos exploratorios (fácilmente biodegradables) también se degradaban en el ensayo de simulación. Algunos de los que no pasaban los ensayos exploratorios sí conseguían pasar los ensayos de biodegradabilidad intrínseca [capítulos C.12 (7) y C.19 (8) del presente anexo], pero solo algunos de este último grupo eran degradados en el ensayo de simulación, mientras que las sustancias que no pasaban los ensayos de biodegradabilidad intrínseca tampoco se degradaban en los ensayos de simulación (9) (10) (11).

4. Para algunos fines son suficientes los ensayos de simulación efectuados con un solo conjunto de condiciones de funcionamiento; los resultados se expresan en porcentaje de la eliminación de la sustancia problema o del carbono orgánico disuelto (COD). En el presente método de ensayo se describe un método de este tipo. Sin embargo, a diferencia de la versión anterior del presente capítulo, que describía un solo tipo de aparato para

▼M4

depurar agua residual sintética en el método de unidades acopladas utilizando un método relativamente sencillo de retirada de lodo, el presente texto ofrece una serie de variaciones. Se describen alternativas del tipo de aparato, del modo de funcionamiento y de eliminación de las aguas residuales y de retirada del lodo. El texto sigue de cerca el de la norma ISO 11733 (12), que fue objeto de mucha atención durante su preparación, aunque el método no se ha sometido a estudio interlaboratorios.

5. Para otros fines, es necesario determinar con mayor precisión la concentración de la sustancia problema en el efluente, para lo cual hace falta un método de mayor envergadura. Por ejemplo, la proporción de lodo retirado debe regularse de forma más precisa a lo largo de cada día y de cada fase del ensayo, y las unidades deben funcionar a diversas proporciones de retirada. Para que el método sea totalmente exhaustivo, es necesario hacer ensayos a dos o tres temperaturas diferentes. Un método de este tipo es descrito por Birch (13) (14) y se resume en el apéndice 6. Sin embargo, los conocimientos actuales son insuficientes para decider cuál de los modelos cinéticos es aplicable a la biodegradación de las sustancias en la depuración de aguas residuales y en el medio acuático en general. La aplicación de una cinética de Monod, señalada en el apéndice 6 como ejemplo, se limita a las sustancias presentes a una concentración de 1 mg/l o más pero, en opinión de algunos autores, incluso este extremo está aún por confirmar. En el apéndice 7 se indican ensayos a concentraciones que reflejan con mayor fidelidad las que se encuentran en las aguas residuales, pero estos ensayos, así como los del apéndice 6, se incluyen como apéndices en lugar de publicarse como métodos de ensayo aparte.

Filtros

6. Se ha prestado mucha menos atención a los modelos de filtros percoladores, quizá debido a que son más engorrosos y menos compactos que los modelos de instalaciones de lodo activado. Gerike *et al.* desarrollaron unas unidades de filtros por goteo y las utilizaron con el método de unidades acopladas (15). Estos filtros son relativamente grandes (2 m de altura y 60 l de volumen) y cada uno requiere hasta 2 l/h de aguas residuales. Baumann *et al.* (16) simularon filtros de goteo insertando tiras de "lana" de poliéster en tubos de 1 m (14 mm de diámetro interior) después de haberlas sumergido en lodo activado concentrado durante 30 min. Se introdujo desde arriba en el tubo vertical la sustancia problema como única fuente de C en una solución de sales minerales, y se evaluó la biodegradación midiendo el COD en el efluente y el CO_2 en el gas emitido.

7. Se han simulado biofiltros de otra manera (15): se ponían en contacto las superficies internas de tubos giratorios, inclinados levemente respecto a la horizontal, con aguas residuales (con un flujo de unos 250 ml/h), tanto con la sustancia problema como sin ella, y en los efluentes recogidos se examinaba la concentración de COD o la de la sustancia problema.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El presente método está concebido para determinar la eliminación y la biodegradación primaria o la final de sustancias orgánicas hidrosolubles por microorganismos aerobios en un sistema de ensayo de funcionamiento continuo que simula el proceso del lodo activado. Las fuentes de carbono y energía para los microorganismos son un medio orgánico fácilmente biodegradable y la sustancia problema orgánica.

9. Se disponen dos unidades de prueba en funcionamiento continuo (instalaciones de lodo activado o depósitos porosos), en paralelo y en las mismas condiciones, elegidas como idóneas para el objetivo del ensayo. Normalmente, el tiempo medio de retención hidráulica es de 6 h y la edad media del lodo (tiempo de retención del lodo) está entre 6 y 10 días. El lodo se retira por uno de los dos métodos, la sustancia problema se añade normalmente al afluente (medio orgánico) de una sola de las unidades, a una concentración de entre 10 y 20 mg/l de carbono orgánico disuelto (COD). La segunda unidad sirve de control para determinar la biodegradación del medio orgánico.

▼M4

10. Se toman muestras frecuentes de los efluentes y en ellas se determina preferentemente el COD, o bien la demanda química de oxígeno (DQO), junto con la concentración de la sustancia problema (en caso necesario) mediante análisis específico, en el efluente de la unidad a la que se añade dicha sustancia. Se acepta que la diferencia entre las concentraciones de COD o de DQO en los efluentes de las unidades de ensayo y de control se debe a la sustancia problema o a sus metabolitos orgánicos. Esta diferencia se compara con la concentración en los afluentes de COD o de DQO debida a la sustancia problema, a fin de determinar la eliminación de dicha sustancia.

11. Normalmente es posible distinguir la biodegradación de la bioadsorción mediante un examen atento de la curva de eliminación respecto al tiempo, y se puede confirmar mediante un ensayo de biodegradación fácil utilizando un inóculo aclimatado procedente de la unidad que recibe la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

12. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados. Normalmente no es posible hacer el ensayo con sustancias volátiles e insolubles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el apéndice 5). También debe conocerse la estructura química, o al menos la fórmula empírica, para poder calcular los valores teóricos o comprobar los valores medidos de ciertos parámetros, como la demanda teórica de oxígeno (DTO), el carbono orgánico disuelto (COD) y la demanda química de oxígeno (DQO).

13. El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para los micororganismos (véase el apéndice 4) puede ser útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de la biodegradación.

UMBRALES

14. En la aplicación original de este ensayo (confirmatorio) de simulación a la biodegradación primaria de tensioactivos, se exige una eliminación del 80 % de la sustancia específica para poder comercializar el tensioactivo. Si no se alcanza el valor del 80 %, puede aplicarse este ensayo (confirmatorio) de simulación y el tensioactivo puede comercializarse solamente si se elimina más del 90 % de la sustancia específica. Con las sustancias en general, no se trata de pasar un umbral sino de que el valor obtenido del porcentaje de la eliminación pueda utilizarse para calcular aproximadamente la concentración probable en el medio ambiente que deba utilizarse en la evaluación del peligro planteado por las sustancias. Los resultados tienden a seguir un modelo de todo o nada. En una serie de estudios de sustancias puras, se observó que el porcentaje de la eliminación de COD era > 90 % en más de tres cuartos y > 80 % en más del 90 % de las sustancias que mostraban un grado significativo de biodegradabilidad.

15. Son relativamente pocas las sustancias (por ejemplo, tensioactivos) que están presentes en las aguas residuales a las concentraciones utilizadas en el presente ensayo (alrededor de 10 mg C/l). Algunas sustancias pueden resultar inhibidoras a estas concentraciones, mientras que la cinética de eliminación de otras puede ser diferente a concentraciones bajas. Podría conseguirse una evaluación más exacta de la degradación utilizando métodos modificados, con concentraciones de la sustancia problema a un nivel más bajo próximo a las situaciones reales, y los datos recogidos podrían utilizarse para calcular las constantes cinéticas. Sin embargo, aún no se han validado las técnicas experimentales necesarias, y tampoco se han establecido los modelos cinéticos que describen las reacciones de biodegradación (véase el apéndice 7).

▼M4

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

16. Para asegurarse de la correcta ejecución del procedimiento experimental, es conveniente someter a ensayo ocasionalmente sustancias cuyo comportamiento se conozca, a la vez que se investigan sustancias problema. Entre esas sustancias se cuentan el ácido adípico, el 2-fenil-fenol, el 1-naftol, el ácido difénico, el ácido 1-naftoico, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

17. Ha habido muchos menos informes de estudios de ensayos de simulación que de ensayos de la biodegradabilidad fácil. La reproducibilidad obtenida con muestras en paralelo es buena (dentro del 10-15 %) en el caso de las sustancias problema degradadas en un 80 % o más, pero la variabilidad es mayor cuando se trata de sustancias que se degradan menos bien. Asimismo, con algunas sustancias límite se han encontrado resultados muy dispares (por ejemplo, 10 %, 90 %) en distintas ocasiones dentro del plazo de 9 semanas permitido en el ensayo.

18. Se ha observado poca diferencia en los resultados obtenidos con los dos tipos de equipo, pero algunas sustancias se han degradado de forma más amplia y sistemática en presencia de agua residual doméstica que con el agua residual sintética de la OCDE.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Equipo

Sistema de ensayo

19. El sistema de ensayo para una sola sustancia problema consiste en una unidad de ensayo y una unidad de control, pero cuando solo se efectúan análisis específicos (biodegradación primaria) únicamente hace falta la unidad de ensayo. Una misma unidad de control puede utilizarse con varias unidades de ensayo que reciban la misma o diferentes sustancias problema. En caso de acoplamiento (apéndice 3), cada unidad de ensayo debe disponer de su propia unidad de control. El sistema de ensayo puede ser bien un modelo de instalación de lodo activado, unidad Husmann (apéndice 1, figura 1), o bien un depósito poroso (apéndice 1, figura 2). En ambos casos es necesario disponer de recipientes de almacenamiento de tamaño suficiente para los afluentes y efluentes, así como bombas para dosificar el afluente, bien mezclado con una disolución de la sustancia problema o bien aparte.

20. Cada instalación de lodo activado consiste en un recipiente de aireación con una capacidad conocida de unos 3 litros de lodo activado y en un separador (depósito de decantación secundario) de una capacidad de unos 1,5 litros; los volúmenes pueden modificarse en cierta medida ajustando la altura del depósito de decantación. Pueden utilizarse recipientes de tamaños diferentes si funcionan con presiones hidráulicas comparables. Si no es posible mantener la temperatura de la sala de ensayo en la banda deseada, se recomienda utilizar recipientes con camisa de agua a temperatura regulada. Se utiliza una bomba de elevación por aire comprimido o una bomba dosificadora para reciclar el lodo activado, pasándolo desde el depósito de decantación al recipiente de aireación, bien de forma continua o bien de forma intermitente, a intervalos periódicos.

21. El sistema de depósito poroso consiste en un cilindro interior, poroso, de fondo cónico, incluido en un recipiente algo más grande, de la misma forma, pero hecho de material plástico impermeable. El recipiente poroso puede estar hecho, por ejemplo, de polietileno poroso con un diámetro máximo de poro de 90 μm y 2 mm de espesor. La separación del lodo respecto al medio orgánico tratado se efectúa mediante el paso diferencial a través de la pared porosa. Los efluentes se recogen en el espacio anular a partir del cual rebosan al recipiente de recogida. No se produce sedimentación y, por tanto, no hay retorno del lodo. El sistema en conjunto puede estar montado en un baño de agua de temperatura regulada. Los depósitos

▼M4

porosos se pueden bloquear y rebosar en las fases iniciales. En tal caso, se debe sustituir el forro poroso por uno limpio, pasando previamente con sifón el lodo del depósito a un cubo limpio y extrayendo el forro bloqueado. Tras limpiar el cilindro exterior impermeable, se inserta un forro limpio y se devuelve el lodo al depósito. El lodo que pueda quedar adherido a los lados del forro bloqueado se raspa cuidadosamente y se transfiere también. Los depósitos bloqueados se limpian primero con un chorro fino de agua para eliminar el lodo restante; luego se sumergen en solución diluida de hipoclorito sódico y después en agua; finalmente, se enjuagan a fondo con agua.

22. Para la aireación del lodo en los recipientes de aireación de ambos sistemas, es necesario aplicar técnicas adecuadas como, por ejemplo, cubos sinterizados (piedras difusoras) y aire comprimido. El aire se limpiará, en caso necesario, pasándolo por un filtro adecuado y lavándolo. Debe pasar suficiente aire a través del sistema para mantener las condiciones aeróbicas y mantener en suspensión los flóculos de lodo todo el tiempo que dure el ensayo.

Equipo de filtración o centrífuga

23. Dispositivo de filtración de muestras con filtros de membrana de porosidad adecuada (diámetro de abertura nominal de 0,45 μm) que adsorban sustancias orgánicas solubles y liberen carbono orgánico en un grado mínimo. Si se utilizan filtros que liberan carbono orgánico, lavar cuidadosamente los filtros con agua caliente para eliminar el carbono orgánico lixiviable. Otra posibilidad es utilizar una centrífuga que pueda alcanzar una aceleración de 40 000 m/s^2.

Equipo analítico

24. Equipo necesario para determinar:

— el COD (carbono orgánico disuelto) y el COT (carbono orgánico total), o la DQO (demanda química de oxígeno),

— la sustancia específica, en su caso,

— los sólidos en suspensión, el pH, la concentración de oxígeno en el agua,

— la temperatura, la acidez y la alcalinidad,

— el amonio, el nitrito y el nitrato, si el ensayo se efectúa en condiciones de nitrificación.

Agua

25. Agua del grifo, con menos de 3 mg/l de COD. Debe determinarse la alcalinidad, en caso de que no se conozca previamente.

26. Agua desionizada, con menos de 2 mg/l de COD.

Medio orgánico

27. Como medio orgánico puede aceptarse agua residual sintética, agua residual doméstica o una mezcla de ambos tipos. Se ha observado (11) (14) que el uso de agua residual doméstica sola suele llevar a un mayor porcentaje de eliminación del COD y que incluso permite la eliminación y la biodegradación de algunas sustancias no biodegradadas cuando se utiliza el agua residual sintética de la OCDE. Asimismo, la adición constante o intermitente de agua residual doméstica suele estabilizar el lodo activado, incluida la capacidad crucial de sedimentar bien. Así pues, se recomienda el uso de agua residual doméstica. Debe medirse la concentración de COD o de DQO en cada nuevo lote de medio orgánico. Es necesario conocer la acidez o la alcalinidad del medio orgánico. Es posible que el medio orgánico requiera la adición de un amortiguador adecuado (carbonato de hidrógeno y sodio, o fosfato de dihidrógeno y potasio) si es baja su acidez o su alcalinidad, para mantener durante el ensayo un pH de alrededor de 7,5 ± 0,5 en el recipiente de aireación. Debe decidirse en cada caso la cantidad de amortiguador que ha de añadirse, y en qué momento hacerlo. Cuando se hagan mezclas tanto de forma continua como de forma intermitente, es necesario mantener aproximadamente constante el valor del COD (o de la DQO) de la mezcla, por ejemplo mediante dilución con agua.

▼M4

Agua residual sintética

28. Disuélvase en cada litro de agua del grifo: peptona, 160 mg; extracto de carne, 110 mg; urea, 30 mg; fosfato de hidrógeno y dipotasio anhidro (K_2HPO_4), 28 mg; cloruro de sodio (NaCl), 7 mg; cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfato de magnesio heptahidratado ($Mg_2SO_4.7H_2O$), 2 mg. El agua residual sintética de la OCDE es un ejemplo y da una concentración media de COD en el afluente de unos 100 mg/l. También es posible utilizar otras composiciones, con la misma concentración aproximada de COD, que se acerquen más al agua residual real. Si hace falta un afluente menos concentrado, puede diluirse el agua residual sintética, por ejemplo en la proporción 1:1, con agua del grifo para obtener una concentración de unos 50 mg/l. Este afluente más débil permitirá un mejor crecimiento de los organismos nitrificantes, y esta modificación debe utilizarse si se tiene que investigar la simulación de las instalaciones de aguas residuales nitrificantes. El agua residual sintética puede elaborarse con agua destilada en forma concentrada y conservarse a alrededor de 1 °C durante una semana como máximo. En el momento en que se necesite, se diluye con agua del grifo. (Este medio no es satisfactorio ya que, por ejemplo, la concentración de nitrógeno es muy elevada y el contenido de carbono es relativamente bajo, pero no se ha sugerido nada mejor, salvo añadir más fosfato como amortiguador y peptona adicional.)

Agua residual doméstica

29. Debe utilizarse agua residual recién decantada, recogida cada día en una depuradora que reciba predominantemente agua residual doméstica. Debe recogerse, antes de la sedimentación primaria, del canal del rebosadero del tanque de sedimentación primaria o de la alimentación a la instalación de lodo activado y encontrarse exenta en gran medida de partículas gruesas. El agua residual puede seguir utilizándose tras guardarse varios días (pero en general no más de siete días) a una temperatura de unos 4 °C, si se demuestra que el COD (o la DQO) no ha descendido de forma significativa (es decir, en menos del 20 %) durante el almacenamiento. A fin de limitar las perturbaciones del sistema, el COD (o la DQO) de cada lote nuevo debe ajustarse a un nivel constante adecuado, antes de utilizarlo, por ejemplo, mediante dilución con agua del grifo.

Lodo activado

30. Debe recogerse lodo activado para la inoculación, a partir del tanque de aireación de una depuradora de aguas residuales que funcione bien o de una unidad de lodo activado de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas.

Soluciones madre de sustancia problema

31. Con sustancias de solubilidad adecuada, deben prepararse soluciones madre a concentraciones apropiadas (por ejemplo, de 1 a 5 g/l) en agua desionizada, o en la porción mineral del agua residual sintética (respecto a las sustancias insolubles y volátiles, véase el apéndice 5). Hay que determinar el COD y el carbono orgánico total (COT) de la solución madre y repetir las mediciones con cada lote nuevo. Si la diferencia entre el COD y el COT es superior al 20 %, ha de comprobarse la hidrosolubilidad de la sustancia problema. Hay que comparar los valores nominales con los valores de COD o la concentración de la sustancia problema medidos por análisis específico de la solución madre, para considerar si la recuperación es suficientemente buena (normalmente puede esperarse > 90 %). Ha de comprobarse, especialmente en el caso de dispersiones, si el COD puede utilizarse como parámetro analítico o si solo es posible utilizar una técnica analítica específica para la sustancia problema. En el caso de dispersiones es necesario centrifugar las muestras. Con cada lote nuevo hay que medir el COD, la DQO o la sustancia mediante análisis específico.

▼M4

32. Determínese el pH de la solución madre. La presencia de valores extremos indica que la adición de la sustancia puede influir en el pH de lodo activado en el sistema de ensayo. En este caso, haya que neutralizar la solución madre para obtener un pH de 7 ± 0,5, utilizando pequeñas cantidades de ácidos o bases inorgánicos, pero evitando la precipitación de la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO

33. Se describe el procedimiento para las unidades de instalaciones de lodo activado; para el sistema de depósito poroso ha de adaptarse ligeramente.

Preparación del inóculo

34. Inocúlese el sistema de ensayo al inicio del ensayo con lodo activado o bien con un inóculo que contenga una pequeña concentración de microorganismos. Manténgase el inóculo aireado a temperatura ambiente hasta que se vaya a utilizar, en el plazo máximo de 24 h. En el primer caso, tómese una muestra de lodo activado del tanque de aireación de una depuradora biológica de aguas residuales que funcione con eficiencia o bien de una depuradora de laboratorio, que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Si se van a simular condiciones de nitrificación, tómese lodo de una depuradora de aguas residuales de nitrificación. Determínese la concentración de sólidos en suspensión y, en caso necesario, concéntrese el lodo por sedimentación, de forma que el volumen añadido al sistema de ensayo sea mínimo. Ha de asegurarse que la concentración inicial de materia seca es de alrededor de 2,5 g/l.

35. En el segundo caso, utilícense como inóculo entre 2 ml/l y 10 ml/l de un efluente procedente de una depuradora biológica de aguas residuales domésticas. Para conseguir tantas especies diferentes de bacterias como sea posible, puede ser conveniente añadir inóculos procedentes de otras fuentes diversas como, por ejemplo, aguas superficiales. En este caso, el lodo activado se va a desarrollar y crecer en el sistema de ensayo.

Dosificación del medio orgánico

36. Hay que asegurarse de que los recipientes del afluente y del efluente, así como los tubos que los unen, se limpian a fondo para eliminar la eventual proliferación microbiana, tanto al principio como durante todo el ensayo. Móntense los sistemas de ensayo en salas donde la temperatura esté regulada (normalmente en la banda de 20-25 °C) o utilícense unidades de ensayo provistas de camisas de agua. Prepárese un volumen suficiente del medio orgánico requerido (puntos 27-29). Llénese inicialmente el recipiente de aireación y el depósito de decantación con el medio orgánico y añádase el inóculo (puntos 34 y 35). Iníciese la aireación de forma que el lodo se mantenga en suspensión y en condiciones aeróbicas, y empiécese a introducir el afluente y a reciclar el lodo sedimentado. Pásese medio orgánico de los recipientes de almacenamiento a los de aireación (puntos 20 y 21) de las unidades de ensayo y de control, y recójanse los efluentes respectivos en recipientes de almacenamiento similares. Para conseguir el tiempo normal de retención hidráulica de 6 h, el medio orgánico se bombea con un caudal de 0,5 l/h. A fin de confirmar este extremo, mídase la cantidad diaria de medio orgánico introducido anotando la reducción de volumen del medio presente en los recipientes de almacenamiento. Serían necesarios otros modos de dosificación para determinar los efectos de una liberación intermitente y de una aportación de sustancias de "choque".

37. Si el medio orgánico se prepara para utilizarlo durante un plazo superior a 1 día, es necesario enfriarlo a unos 4 °C o aplicar otros métodos adecuados de conservación para impedir el crecimiento microbiano y la biodegradación fuera de las unidades de ensayo (punto 29). Si se utiliza agua residual sintética, es posible preparar y conservar a unos 4 °C una solución madre concentrada (por ejemplo, a una concentración 10 veces superior a la normal, punto 28) Esta solución madre puede mezclarse bien con el volumen adecuado de agua del grifo antes de utilizarla; otra posibilidad consiste en bombearla directamente a la vez que se bombea aparte la cantidad adecuada de agua del grifo.

▼M4

Dosificación de la sustancia problema

38. Añádase un volumen adecuado de la solución madre de sustancia problema (punto 31) al recipiente de almacenamiento del afluente o introdúzcase directamente con una bomba aparte en el recipiente de aireación. La concentración de ensayo media normal en el afluente debe situarse entre 10 y 20 mg/l de COD, con una concentración máxima no superior a 50 mg/l. Si la hidrosolubilidad de la sustancia problema es baja o resulta probable que aparezcan efectos tóxicos, puede reducirse la concentración a 5 mg/l de COD, o incluso menos, pero solo si existe y se utiliza un método analítico específico adecuado (las sustancias problema dispersadas que son poco hidrosolubles pueden añadirse mediante técnicas de dosificación especiales, véase el apéndice 5).

39. Se empieza a añadir la sustancia problema cuando el sistema se haya estabilizado y ya esté reduciendo eficientemente el COD del medio orgánico (alrededor del 80 %). Es importante comprobar que todas las unidades funcionan con la misma eficiencia antes de la adición de la sustancia problema; en caso contrario, suele ser útil mezclar los distintos lodos y volver a repartirlos en cantidades iguales a cada unidad. Cuando se utilice un inóculo de unos 2,5 g/l (en peso seco), es posible añadir la sustancia problema desde el inicio del ensayo ya que la adición directa de cantidades crecientes desde el principio ofrece la ventaja de que el lodo activado puede adaptarse mejor a la sustancia problema. Independientemente de la manera de añadir la sustancia problema, se recomienda que se midan a intervalos regulares el caudal pertinente y/o los volúmenes de los recipientes de almacenamiento.

Manipulación del lodo activado

40. La concentración de sólidos del lodo activado suele estabilizarse entre unos límites durante el ensayo, independientemente del inóculo utilizado, en la banda de 1 a 3 g/l (en peso seco), en función de la calidad y de la concentración del medio orgánico, las condiciones de funcionamiento, la naturaleza de los microorganismos presentes y la influencia de la sustancia problema.

41. Procédase bien a determinar los sólidos en suspensión de los recipientes de aireación al menos una vez por semana y desechar el exceso de lodo para mantener la concentración entre 1 y 3 g/l (en peso seco), o bien a controlar la edad media del lodo para conseguir un valor constante, normalmente en la banda de 6 a 10 días. Si, por ejemplo, se elige un tiempo de retención del lodo de 8 días, hay que eliminar cada día 1/8 del volumen del lodo activado presente en el recipiente de aireación y desecharlo. Esta operación debe realizarse cada día o, preferentemente, mediante una bomba que funcione de forma automática e intermitente. El mantener constante (o dentro de unos límites estrechos) la concentración de sólidos en suspensión no mantiene constante el tiempo de retención del lodo (TRL), que es la variable operativa que determina el valor de la concentración de la sustancia problema en el efluente.

42. A lo largo de todo el ensayo debe retirarse, con una fecuencia al menos diaria, todo el lodo que se adhiera a las paredes del recipiente de aireación y del depósito de decantación, de forma que se vuelva a suspender. Obsérvense y límpiense periódicamente todos los tubos para evitar el crecimiento de biopelículas. El lodo sedimentado del depósito de decantación se recicla introduciéndolo de nuevo en el recipiente de aireación, de preferencia mediante bombeo intermitente. En el sistema de depósito poroso no se efectúa ningún reciclado, pero ha de asegurarse la introducción de cilindros internos limpios antes de que el volumen del recipiente aumente significativamente (punto 21).

43. En las unidades Husmann puede darse escasa sedimentación y pérdida de lodo. Estas unidades pueden rectificarse aplicando una o varias de las medidas que figuran a continuación, en paralelo en las unidades de ensayo y de control:

— puede añadirse a intervalos periódicos (por ejemplo, cada semana) lodo nuevo o floculante (por ejemplo, 2 ml/recipiente de solución de $FeCl_3$ de 50 g/l), pero asegurándose de que no se produce ninguna precipitación ni reacción de la sustancia problema con el $FeCl_3$,

▼M4

— puede sustituirse la bomba de elevación por aire comprimido mediante una bomba peristáltica, permitiendo así un flujo de recirculación de lodo que compensa aproximadamente el flujo de afluente que debe utilizarse y permitiendo el desarrollo de una zona anaerobia en el lodo sedimentado (la geometría de la bomba de aire comprimido limita el caudal mínimo del lodo retornado a unas 12 veces el del afluente),

— puede bombearse intermitentemente lodo desde el depósito de decantación al recipiente de aireación (por ejemplo, 5 min. cada 2,5 h para reciclar entre 1 l/h y 1,5 l/h),

— puede utilizarse un agente antiespumante no tóxico a una concentración mínima, para evitar pérdidas por formación de espuma (por ejemplo, aceite de silicona),

— puede pasarse aire a través del lodo en el depósito de decantación en forma de fuertes impulsos breves (por ejemplo, de 10 sec cada hora),

— es posible añadir el medio orgánico al recipiente de aireación a intervalos (por ejemplo, de 3 a 10 min cada hora).

Muestreo y análisis

44. A intervalos periódicos debe medirse la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura y el valor del pH del lodo activado presente en los recipientes de aireación. Hay que velar por que siempre se disponga de oxígeno suficiente (> 2 mg/l) y que la temperatura se mantenga en la banda necesaria (normalmente, de 20 a 25 °C). Manténgase el pH a 7,5 ± 0,5 añadiendo al recipiente de aireación o al afluente pequeñas cantidades de base o ácido inorgánico, o aumentando la capacidad de amortiguación del medio orgánico (véase el punto 27). Cuando se efectúa la nitrificación se produce ácido: la oxidación de 1 mg de N produce el equivalente de unos 7 mg de CO_3^-. La frecuencia de las mediciones depende del parámetro que se mida y de la estabilidad del sistema, y puede variar entre diaria y semanal.

45. Mídanse el COD o la DQO en los afluentes que entran en los recipientes de control y de ensayo. Mídase la concentración de la sustancia problema en el afluente de la unidad de ensayo mediante análisis específico o estímese a partir de la concentración en la solución madre (punto 31), el volumen utilizado y la cantidad de agua residual introducida en la unidad de ensayo. Se recomienda calcular la concentración de la sustancia problema para reducir la variabilidad de los datos de concentración.

46. Tómense muestras adecuadas del afluente recogido (por ejemplo, muestras compuestas de 24 h) y filtrense por una membrana de 0,45 μm de diámetro de poro, o centrifúguense a unos 40 000 m/s^2 durante 15 min aproximadamente. La centrifugación debe utilizarse si resulta difícil realizar la filtración. Determínese el COD o la DQO al menos por duplicado para medir la biodegradación final y, en caso necesario, la biodegradación primaria mediante un análisis específico de la sustancia problema.

47. El uso del COD puede ocasionar problemas analíticos a concentraciones bajas, por lo que se recomienda solo si se utiliza una concentración suficientemente alta de la sustancia problema (unos 30 mg/l). Asimismo, en caso de sustancias muy adsorbentes, se recomienda medir la cantidad de sustancia adsorbida en el lodo mediante una técnica analítica específica de la sustancia problema.

48. La frecuencia del muestreo depende de la duración prevista del ensayo. Es recomendable una frecuencia de tres veces por semana. Una vez que las unidades estén funcionando con eficiencia, debe dejarse pasar entre 1 semana y un máximo de 6 semanas después de la introducción de la sustancia problema, para permitir que se alcance el estado de equilibrio. Es preferible obtener al menos 15 valores válidos en la fase de meseta (punto 59), que dura normalmente 3 semanas, para la evaluación del resultado del ensayo. El ensayo puede completarse si se alcanza un grado suficiente de eliminación (por ejemplo, > 90 %) y se dispone de estos 15 valores, que representan análisis efectuados cada día laborable durante 3 semanas. Normalmente, no debe llegarse a una duración del ensayo superior a 12 semanas tras la adición de la sustancia problema.

▼M4

49. Si se produce nitrificación en el lodo, y si se quiere estudiar los efectos de la sustancia problema sobre la nitrificación, debe analizarse el contenido de amonio y/o de nitrito más nitrato en muestras tomadas del afluente de las unidades de ensayo y de control, al menos una vez por semana.

50. Todos los análisis deben llevarse a cabo lo antes posible, especialmente las determinaciones de nitrógeno. Si resulta necesario retrasar un análisis, las muestras deben conservarse a unos 4 °C a oscuras, en frascos llenos y bien cerrados. Si resulta necesario almacenar las muestras durante más de 48 h, hay que conservarlas por ultracongelación, por acidificación (por ejemplo, 10 ml/l de una solución de ácido sulfúrico de 400 g/l) o por adición de una sustancia tóxica adecuada [por ejemplo, 20 ml/l de una solución de cloruro de mercurio (II) de 10 g/l]. Hay que verificar que la técnica de conservación no altera los resultados de los análisis.

Acoplamiento de unidades de ensayo

51. Si se utiliza el acoplamiento (apéndice 3), hay que intercambiar cada día la misma cantidad de lodo activado (entre 150 y 1 500 ml en el caso de recipientes de aireación que contienen 3 litros de líquido) entre los recipientes de aireación de la unidad de ensayo y de su unidad de control. Si la sustancia problema se adsorbe fuertemente al lodo, debe cambiarse solo el sobrenadante de los depósitos de decantación. En ambos casos hay que aplicar un factor de corrección para calcular los resultados del ensayo (punto 55).

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

52. Calcúlese el porcentaje de eliminación de la sustancia problema en términos de COD o de DQO respecto a cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

donde:

D_t = % de eliminación del COD o de la DQO al tiempo t

C_s = valores de COD o DQO en el afluente debidos a la sustancia problema, de preferencia estimados a partir de la solución madre (mg/l)

E = valores de COD o DQO medidos en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l)

E_o = valores de COD o DQO medidos en el afluente de control al tiempo t (mg/l)

53. El grado de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico en la unidad de control es un dato útil para evaluar la actividad de biodegradación del lodo activado durante el ensayo. Calcúlese el porcentaje de eliminación con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

donde:

D_B = % de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico de la unidad de control al tiempo t

C_M = valores de COD o de DQO del medio orgánico en el afluente de control (mg/l)

▼M4

También es posible calcular el porcentaje de eliminación del COD o de la DQO debidos al medio orgánico más la sustancia problema en la unidad de ensayo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

donde:

D_T = % de eliminación del COD o de la DQO en la totalidad del afluente de ensayo

C_T = valores de COD o de DQO de la totalidad del afluente de ensayo o calculados a partir de las soluciones madre (mg/l)

54. Calcúlese la eliminación de la sustancia problema si se mide con un método analítico específico en cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

donde:

D_{ST} = % de eliminación primaria de la sustancia problema al tiempo t

S_i = concentración medida o estimada de la sustancia problema en el afluente de ensayo (mg/l)

S_e = concentración medida de la sustancia problema en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l)

55. Si se ha utilizado el modo de acoplamiento, compénsese la dilución de la sustancia problema en el recipiente de aireación debida al intercambio de lodo utilizando un factor de corrección (véase el apéndice 3). Si se ha aplicado un tiempo medio de retención hidráulica de 6 h y el intercambio de la mitad del volumen del lodo activado en el recipiente de aireación, es necesario corregir los valores de eliminación determinados diariamente (D_t, punto 52) para obtener el grado real de eliminación, D_{tc}, de la sustancia problema con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Expresión de los resultados del ensayo

56. Represéntese el porcentaje de eliminación D_t (o D_{tc}) y D_{st}, si está disponible, frente al tiempo (véase el apéndice 2). Es posible extraer conclusiones sobre el proceso de eliminación a partir de la forma de la curva de eliminación de la sustancia problema (en sí misma o como COD).

Adsorción

57. Si desde el inicio del ensayo se observa una elevada eliminación del COD de la sustancia problema, es probable que esta se elimine por adsorción a los sólidos del lodo activado. Es posible comprobar este extremo determinando la sustancia problema adsorbida mediante análisis específico. No es normal que la eliminación del COD de sustancias adsorbidas se mantenga elevada durante todo el ensayo; normalmente la eliminación es intensa al principio y después va cayendo gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio. Si, no obstante, la sustancia problema adsorbida pudiera causar de alguna forma la aclimatación de la población microbiana, la eliminación del COD de la sustancia problema aumentaría posteriormente y alcanzaría un elevado nivel de meseta.

▼M4

Tiempo de latencia

58. Como en los ensayos estáticos exploratorios, muchas sustancias problema requieren una fase de latencia antes de que se produzca la biodegradación plena. En esta fase de latencia tiene lugar la aclimatación o adaptación de las bacterias de degradación, sin que haya apenas eliminación de la sustancia problema; después empieza el crecimiento de estas bacterias. Esta fase termina y se supone que comienza la fase de degradación cuando se ha eliminado alrededor del 10 % de la cantidad inicial de sustancia problema (después de tener en cuenta la adsorción, en su caso). La fase de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

Fase de meseta

59. La fase de meseta de una curva de eliminación en un ensayo continuo se define como la fase en que se produce el máximo de degradación. La fase de meseta debe durar al menos 3 semanas y permitir la medición de unos 15 valores válidos.

Grado medio de eliminación de la sustancia problema

60. Calcular la media de los valores de eliminación (D_t) de la sustancia problema en la fase de meseta. Redondeado al entero más próximo (1 %), es el grado de eliminación de la sustancia problema. Se recomienda calcular asimismo el intervalo de confianza del 95 % para la media.

Eliminación del medio orgánico

61. Represéntese frente al tiempo el porcentaje de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico en la unidad de control (D_B). Indíquese el grado medio de eliminación de la misma forma que con la sustancia problema (punto 60).

Indicación de la biodegradación

62. Si la sustancia problema no se adsorbe significativamente al lodo activado y la curva de eliminación tiene la forma típica de una curva de biodegradación con fases de latencia, de degradación y de meseta (puntos 58 y 59), la eliminación medida puede atribuirse con seguridad a la biodegradación. Si ha tenido lugar una eliminación inicial importante, el ensayo de simulación no puede diferenciar entre el proceso de eliminación biológico y el abiótico. En tales casos, y en otros en que haya alguna duda sobre la biodegradación (por ejemplo, si se produce eliminación), se deben analizar las sustancias problema adsorbidas o efectuar ensayos adicionales de biodegradación estática, con parámetros que indiquen claramente si se trata de procesos biológicos. Tales ensayos son los métodos de consumo de oxígeno [capítulo C.4-D, E y F del presente anexo (6)] o un ensayo con medición de la producción de dióxido de carbono [capítulo C.4-C del presente anexo (6)], o el método del espacio de cabeza de la ISO (18), utilizando un inóculo preexpuesto del ensayo de simulación. Si se han medido tanto la eliminación del COD como la eliminación específica de la sustancia, una diferencia significativa (siendo la primera más baja que la segunda) entre los porcentajes de eliminación indica la presencia en los efluentes de productos orgánicos intermedios que pueden ser más difíciles de degradar que la sustancia original.

Validez de los resultados del ensayo

63. Mediante la determinación del grado de eliminación del medio orgánico (punto 53) en la unidad de control se consigue información sobre el comportamiento normal de biodegradación del inóculo. Se considera que el ensayo es válido si el grado de eliminación del COD o de la DQO en la unidad o unidades de control es > 80 % tras dos semanas y no se han observado fenómenos inusuales.

▼M4

64. Si se ha utilizado una sustancia (de referencia) fácilmente biodegradable, el grado de biodegradación (D_t, punto 52) debe ser > 90 %.

65. Si el ensayo se realiza en condiciones de nitrificación, la concentración media en los efluentes debe ser < 1 mg/l de N amoniacal y < 2 mg/l de N nitroso.

66. Si no se cumplen estos criterios (puntos 63-65), repítase el ensayo utilizando un inóculo de una fuente diferente, sométase a ensayo una sustancia de referencia y revísense todos los procedimientos experimentales.

Informe del ensayo

67. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Datos de identificación.

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas.

Condiciones de ensayo:

— Tipo de sistema de ensayo, eventuales modificaciones para el ensayo de sustancias insolubles y volátiles.

— Tipo de medio orgánico.

— Proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se conocen.

— Inóculo, naturaleza y lugar o lugares de recogida, concentración y posible tratamiento previo.

— Solución madre de sustancia problema: contenido de COD y COT, forma de preparación si se trata de una suspensión, concentración utilizada en el ensayo, justificación del eventual recurso a concentraciones fuera de la banda de 10 a 20 mg/l de COD, método de adición, fecha de la primera adición, cambios eventuales.

— Edad media del lodo y tiempo medio de retención hidráulica, método de retirada del lodo, métodos para solucionar la aglomeración, la pérdida de lodo, etc.

— Técnicas analíticas empleadas.

— Temperatura del ensayo.

— Cualidades de la aglomeración del lodo, índice volumétrico de lodo (IVL), sólidos en suspensión en el licor mixto (SSLM).

— Eventuales desviaciones respecto a los procedimientos normalizados y circunstancias que puedan afectar a los resultados.

Resultados del ensayo:

— Todos los datos medidos (COD, DQO, análisis específicos, pH, temperatura, concentración de oxígeno, sólidos en suspensión, sustancias nitrogenadas (cuando sea pertinente).

— Todos los valores calculados de D_t (o D_{tc}), D_B, D_{St} obtenidos en formato tabular y las curvas de eliminación.

— Información de las fases de latencia y de meseta, duración del ensayo, grado de eliminación de la sustancia problema y del medio orgánico en la unidad de control, junto con información estadística y declaraciones sobre la biodegradabilidad y la validez del ensayo.

— Discusión de los resultados.

▼**M4**

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

(7) Capítulo C.12 del presente anexo. Biodegradación — Prueba LASC modificada.

(8) Capítulo C.19 del presente anexo. Cálculo del coeficiente de adsorción (KOC) en suelos y en lodos de aguas residuales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp. 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revisada de 2004). Evaluación de la eliminación y de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos en medio acuoso-ensayo de simulación de lodos activados.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornadas Com. Español. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat. Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Calidad del agua-Evaluación de la biodegradabilidad final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico en recipientes cerrados.

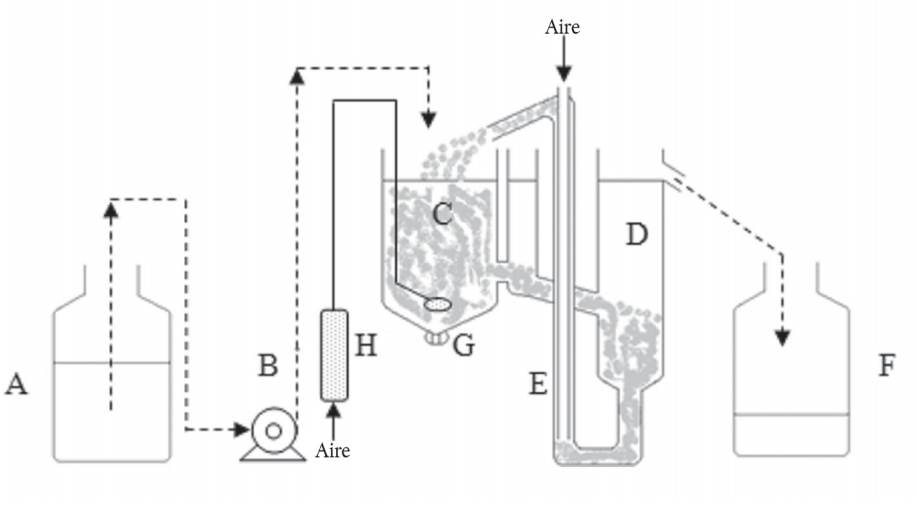
▼M4

Apéndice 1

Figura 1

Equipo utilizado para evaluar la biodegradabilidad

Unidad de Husmann

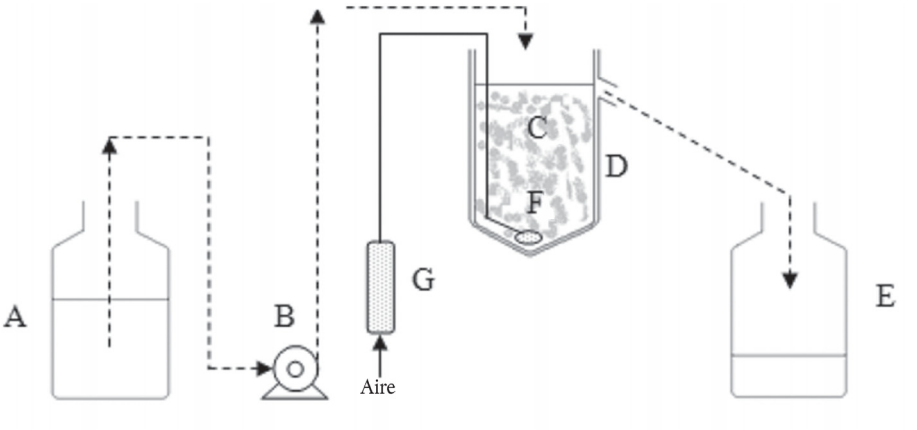


A. Recipiente de almacenamiento
B. Bomba dosificadora
C. Cámara de aireación (3 l de capacidad)
D. Recipiente de sedimentación
E. Bomba de elevación por aire comprimido
F. Recipiente de recogida
G. Aireador
H. Caudalímetro de aire

Figura 2

Equipo utilizado para evaluar la biodegradabilidad

Depósito poroso

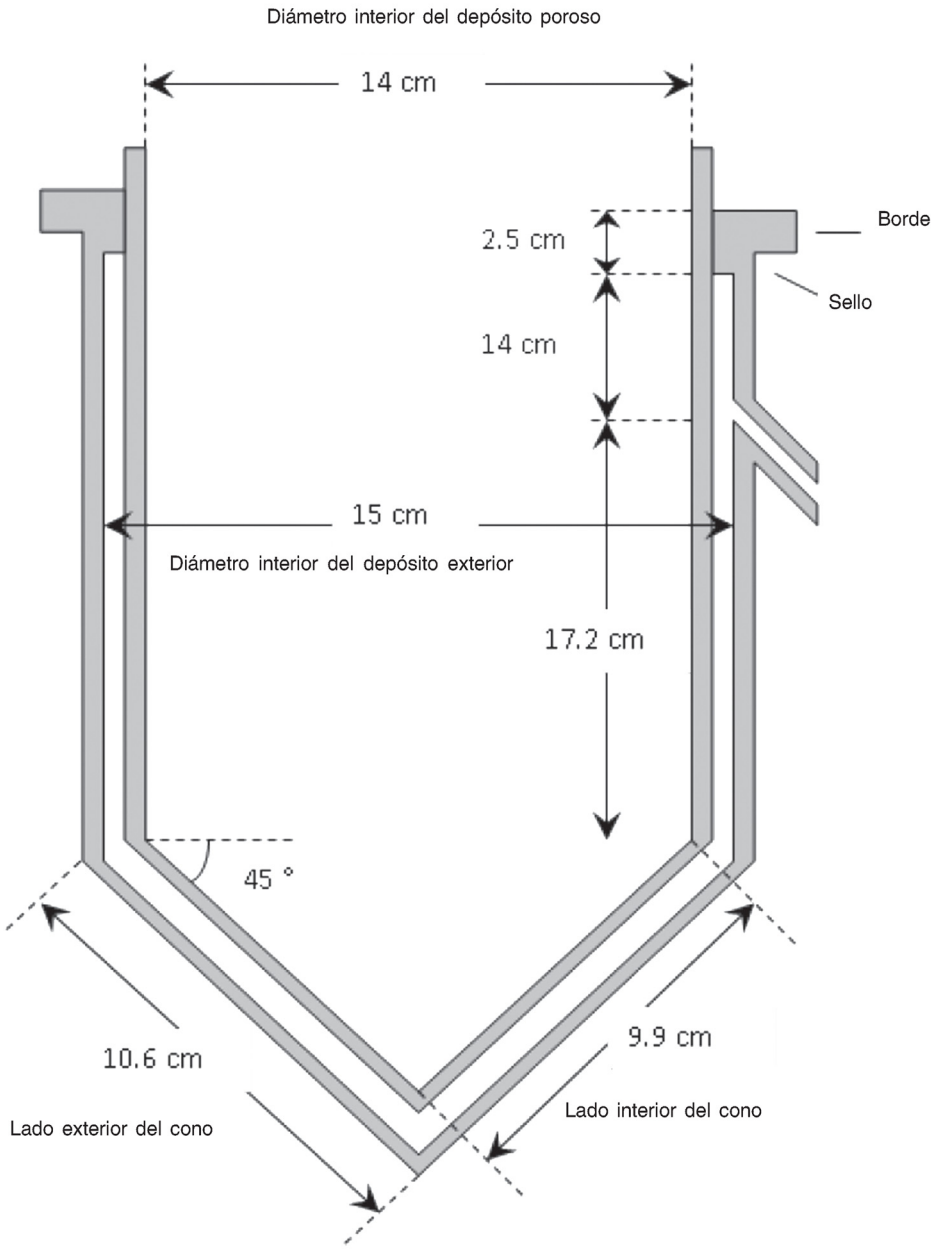


A. Recipiente de almacenamiento
B. Bomba dosificadora
C. Recipiente de aireación poroso
D. Recipiente impermeable exterior
E. Recipiente de recogida
F. Difusor
G. Caudalímetro de aire

▼M4

Figura 3

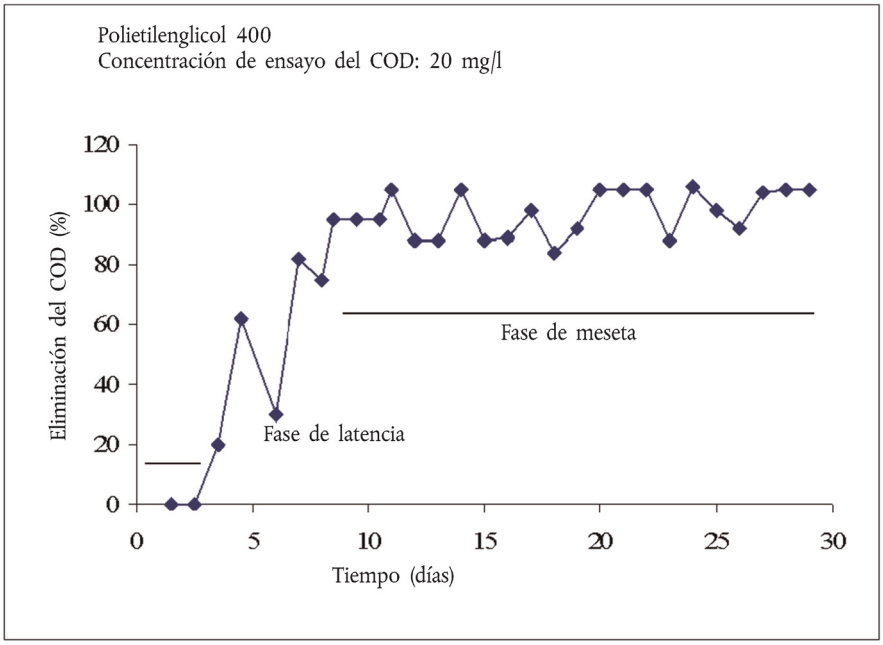
Detalles del recipiente de aireación con depósito poroso de tres litros



▼**M4**

Apéndice 2

Ejemplo de curva de eliminación



▼M4

Apéndice 3

[CON CARÁCTER INFORMATIVO]

ACOPLAMIENTO DE LAS UNIDADES DE ENSAYO

A fin de equilibrar las poblaciones microbianas de los lodos presentes en la unidad de ensayo, que recibe el agua residual más la sustancia problema, y en la unidad de control, que solo recibe el agua residual, se introdujo el intercambio diario de lodos (1). El procedimiento se denominó acoplamiento y el método se conoce como el de unidades acopladas. El acoplamiento se llevó a cabo inicialmente utilizando las unidades de lodo activado de Husmann, pero también se ha aplicado a unidades de depósito poroso (2) (3). No se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando unidades acopladas y los obtenidos utilizando unidades no aclopadas, ni con unidades Husmann ni con depósitos porosos, por lo que no ofrece ninguna ventaja dedicar tiempo y energía a acoplar las unidades.

Los intercambios de lodos pueden dar la apariencia de una eliminación considerable, ya que parte de la sustancia problema se transfiere y las concentraciones de esta sustancia problema en los efluentes de ensayo y de control llegan a equilibrarse más. Así pues, es necesario utilizar factores de corrección, que dependen de la fracción intercambiada y del tiempo medio de retención hidráulica. Se han publicado más detalles del cálculo (1).

Calcúlese el grado corregido de eliminación de COD o de DQO utilizando la fórmula general siguiente:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\%$$

donde:

D_{tc} = porcentaje corregido de eliminación de COD o de DQO

D_t = porcentaje determinado de eliminación de COD o de DQO

a = fracción intercambiada del volumen de las unidades de lodo activado

r = tiempo medio de retención hidráulica (h)

Si, por ejemplo, se intercambia la mitad del volumen del tanque de aireación (a = 0,5) y el tiempo medio de retención hidráulica es de 6 h, la fórmula de corrección es la siguiente:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Apéndice 4

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL LODO ACTIVADO

Procedimiento con sustancias problema

1. Es posible que una sustancia (o un agua residual) no se degrade ni se elimine en el ensayo de simulación, e incluso que tenga un efecto inhibidor sobre los microorganismos del lodo. Otras sustancias se biodegradan a pequeñas concentraciones pero son inhibidoras a concentraciones más elevadas (hormesis). Los efectos inhibidores pueden haberse puesto de manifiesto en una fase anterior o haberse determinado en un ensayo de toxicidad, utilizando un inóculo similar o idéntico al utilizado en el ensayo de simulación (1). Tales métodos son la inhibición del consumo de oxígeno [capítulo C.11 del presente anexo (2) y norma ISO 8192(3)] o la inhibición del crecimiento de los organismos del lodo [ISO 15522 (4)].

2. En el ensayo de simulación, la eventual inhibición se manifiesta en que la diferencia en carbono orgánico disuelto (COD) o en demanda química de oxígeno (DQO) entre el efluente del recipiente de ensayo y el del recipiente de control es mayor que el COD añadido como sustancia problema. Dicho de otra manera, el porcentaje de eliminación de COD [(y de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), de demanda química de oxígeno (DQO) y/o de NH^{+}_{4})] del medio orgánico en tratamiento se ve reducido por la presencia de la sustancia problema. Si ocurre esto, es necesario repetir el ensayo reduciendo la concentración de la sustancia problema hasta que se alcance un nivel al que no se produzca inhibición, y quizás reduciendo aún más la concentración hasta que la sustancia problema sea biodegradada. Sin embargo, si la sustancia problema (o el agua residual) tiene efectos negativos sobre el proceso a todas las concentraciones ensayadas, se puede deducir que la sustancia es difícil, o incluso imposible, de tratar biológicamente, pero puede merecer la pena repetir el ensayo con lodo activado procedente de otra fuente o someter el lodo a una aclimatación más gradual.

3. Inversamente, si la sustancia problema se bioelimina al primer intento en el ensayo de simulación, debe aumentarse su concentración cuando se necesite saber si esta sustancia puede ser inhibidora.

4. Al tratar de determinar el grado de inhibición, ha de tenerse presente que puede cambiar la población del lodo activado, de forma que con el tiempo los microorganismos pueden desarrollar tolerancia frente a una sustancia inhibidora.

5. Cálculo del grado de inhibición:

   Los porcentajes generales de eliminación R_o, de DBO, COD, DQO, etc., de las unidades de ensayo y de control pueden calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   donde:

   I = concentración de DBO, COD, DQO, etc., en los afluentes de los recipientes de ensayo o de control (mg/l)

   E = concentraciones en los efluentes respectivos (mg/l)

   Es necesario corregir I y E para tener en cuenta el COD debido a la sustancia problema en las unidades de ensayo; en caso contario, serán incorrectos los cálculos del porcentaje de inhibición.

▼**M4**

El grado de inhibición debido a la presencia de la sustancia problema puede calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibicion} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

donde:

R_c = porcentaje de eliminación en los recipientes de control

R_t = porcentaje de eliminación en los recipientes de ensayo

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Capítulo C.11 del presente anexo. Biodegradación — Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.

(3) ISO 8192 (2007): Calidad del agua — Ensayo de inhibición del consumo de oxígeno por lodos activados por oxidación del carbono y del amonio.

(4) ISO 15522 (1999) Calidad del agua — Determinación del efecto inhibidor de los componentes del agua sobre los microorganismos de los lodos activados.

▼M4

Apéndice 5

Sustancias problema poco hidrosolubles — sustancias volátiles

Sustancias poco hidrosolubles

Parece que se han publicado pocos informes sobre la posibilidad de someter las sustancias poco hidrosolubles e insolubles a ensayos de simulación del tratamiento de las aguas residuales (1) (2) (3).

No hay un solo método de dispersión de la sustancia problema que pueda aplicarse a todas las sustancias insolubles. Parece que dos de los cuatros tipos de métodos descritos en la norma ISO 10634 (4) pueden ser adecuados para intentar dispersar las sustancias problema para el ensayo de simulación; consisten en el uso de emulgentes y de energía de ultrasonidos. Hay que determinar la estabilidad de la dispersión resultante a lo largo de períodos de al menos 24 h. La dispersión estabilizada de forma adecuada en un depósito con agitación constante (punto 38) se pasa al tanque de aireación aparte del agua residual doméstica (o sintética).

Si las dispersiones son estables, investíguese cómo puede determinarse la sustancia problema en la forma dispersa. Resulta poco probable que el COD sea adecuado, por lo que debería establecerse un método analítico específico para la sustancia problema que pueda aplicarse a los efluentes, a los sólidos del efluente y al lodo activado. Entonces se determinaría el destino de la sustancia problema en la simulación del proceso del lodo activado, tanto en la fase líquida como en la sólida. Por tanto, se establecería un "balance de masas" para decidir si la sustancia problema se ha degradado. Sin embargo, de esta forma se indicaría solo la biodegradación primaria. Debe intentarse demostrar la biodegradación final mediante un ensayo de respirometría (capítulo C.4-C, F o D del presente anexo) (5) utilizando como inóculo lodo expuesto a la sustancia problema en el ensayo de simulación.

Sustancias volátiles

La aplicación de simulaciones de la depuración de agua residual a las sustancias volátiles es controvertida y problemática. Igual que en el caso de las sustancias poco hidrosolubles, se encuentran muy pocos informes publicados sobre ensayos de simulación de sustancias volátiles. Se adapta un tipo convencional de aparato de mezcla completa sellando los tanques de aireación y de sedimentación, midiendo y controlando el flujo de aire con caudalímetros y pasando el gas de salida por trampas para recoger la materia orgánica volátil. En ciertos casos se utiliza una bomba de vacío para extraer el gas de salida a través de una trampa "fría" o una trampa de purga que contenga Tenax y gel de sílice para efectuar después análisis cromatográficos de gases. La sustancia problema presente en la trampa puede determinarse analíticamente.

El ensayo se lleva a cabo en dos partes. En primer lugar se hacen funcionar las unidades sin lodo pero bombeando al tanque de aireación el agua residual sintética más la sustancia problema. Se toman muestras del afluente, del efluente y del gas de salida, y se analizan para determinar su contenido en sustancia problema durante varios días. A partir de los datos obtenidos, es posible calcular el porcentaje (R_{vs}) de sustancia problema eliminado del sistema.

A continuación se efectúa el ensayo biológico normal (con lodo), en condiciones de funcionamiento idénticas a las del estudio de eliminación. También se toman mediciones del COD o de la DQO para comprobar que las unidades funcionan de forma eficiente. Se efectúan análisis ocasionales para determinar la presencia de sustancia problema en el afluente, en el efluente y en el gas de salida de la primera parte del ensayo; tras la aclimatación se efectúan análisis con más frecuencia. También aquí es posible calcular, a partir de los datos del estado de equilibrio, el porcentaje de eliminación de la sustancia problema a partir de la fase líquida mediante todos los procesos (R_T) (físicos y biológicos), así como la proporción (R_V) eliminada del sistema.

▼**M4**

Cálculo

a) En el ensayo no biológico, es posible calcular el porcentaje (R_{VP}) de sustancia problema eliminado del sistema con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

donde:

R_{VP} = eliminación de la sustancia problema por volatilización (%),

S_{VP} = sustancia problema recogida en la trampa, expresada en concentración equivalente de la fase líquida (mg/l),

S_{IP} = concentración de la sustancia problema en el afluente (mg/l).

b) En el ensayo biológico, es posible calcular el porcentaje (R_V) de sustancia problema eliminado del sistema con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

donde:

R_V = eliminación de la sustancia problema por volatilización en el ensayo biológico (%),

S_V = sustancia problema recogida en la trampa en el ensayo biológico, expresada en concentración equivalente del afluente líquido (mg/l),

S_I = concentración de la sustancia problema en el afluente (mg/l).

c) En el ensayo biológico, el porcentaje de sustancia problema eliminado por todos los procesos viene dado por la fórmula siguiente:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

donde:

S_E = concentración de la sustancia problema en el efluente (líquido) (mg/l).

d) Así pues, el porcentaje (R_{BA}) eliminado por biodegradación más adsorción puede calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Deben llevarse a cabo ensayos separados para determinar si la sustancia problema se adsorbe; en caso afirmativo, es posible aplicar otra corrección más.

e) La comparación entre la proporción de sustancia problema eliminada de los sistemas de ensayo biológico (R_v) y no biológico (R_{vp}) indica el efecto general que ha tenido el tratamiento biológico sobre la emisión de la sustancia problema a la atmósfera.

Ejemplo: Benceno

Tiempo de retención del lodo = 4 días

Agua residual sintética; tiempo de retención = 8 h

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Así pues,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % y R_{BA} = 85 %.

Se deduce que el benceno no es adsorbido por el lodo.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.

(5) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

▼M4

Apéndice 6

Efectos del tiempo de retención del lodo (TRL) para el tratamiento de las sustancias

INTRODUCCIÓN

1. El método descrito en el texto principal se ideó para determinar si las sustancias objeto del ensayo (generalmente, aquellas de las que se sabe que son intrísecamente biodegradables, pero no fácilmente biodegradables) pueden biodegradarse dentro de los límites impuestos en las depuradoras de aguas residuales. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de eliminación y de porcentaje de biodegradación. Las condiciones de funcionamiento de las unidades de lodo activado y la elección del afluente permiten variaciones bastante amplias en la concentración de la sustancia problema en el efluente. Los ensayos se efectúan a una sola concentración nominal o a un solo tiempo nominal de retención del lodo (TRL) y los regímenes de retirada de lodo descritos pueden hacer que el valor del TRL varíe considerablemente tanto de un día a otro como a lo largo de un mismo día.

2. En esta variante (1) (2), el TRL se controla dentro de unos límites mucho más estrechos durante la totalidad de cada período de 24 h (igual que sucede a gran escala), lo que hace que la concentración en los efluentes sea más constante. Se recomienda utilizar agua residual doméstica porque da unos porcentajes de eliminación más constantes y elevados. Asimismo, se investigan los efectos de una serie de valores del TRL y es posible determinar en un estudio más detallado los efectos de una serie de temperaturas sobre la concentración en el efluente.

3. No hay acuerdo general sobre qué modelos cinéticos son aplicables cuando se biodegradan sustancias en las condiciones de la depuración de aguas residuales. Se eligió el modelo de Monod de crecimiento bacteriano y de utilización del sustrato (1) (2) para aplicarlo a los datos recogidos, ya que el método estaba destinado a aplicarse solo a las sustancias producidas en grandes cantidades, lo que lleva a concentraciones superiores a 1 mg/l en las aguas residuales. La validez del modelo simplificado y de las suposiciones aceptadas se estableció utilizando una serie de etoxilatos de alcohol con diversos grados de biodegradabilidad primaria (2) (3).

Nota: Esta variante del método sigue muy de cerca el grueso del texto del método de ensayo C.10-A, y a continuación se indican solo los detalles en que difiere.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

4. Se utilizan depósitos porosos de lodo activado, diseñados para facilitar la retirada (casi) continua de mezcla líquida para permitir un control muy preciso del tiempo de retención del lodo (TRL, o θ_s), en modo sin acoplamiento con una serie de TRL y, de forma optativa, con una serie de temperaturas. El tiempo de retención suele ser de 2 a 10 días y la temperatura varía entre 5 y 20 °C. Se introducen en las unidades, por separado, el agua residual, preferentemente de tipo doméstico, y la solución de la sustancia problema, a un caudal que permita alcanzar el tiempo deseado de retención del agua residual (de 3 a 6 horas) y la concentración deseada de sustancia problema en el afluente. Con fines comparativos, se hacen funcionar en paralelo unidades de control sin sustancia problema.

5. Pueden utilizarse otros tipos de aparatos, pero debe ponerse mucha atención para velar por que se consiga un buen control del TRL. Por ejemplo, cuando se utilicen instalaciones que incorporen un sedimentador, puede ser necesario tener en cuenta la pérdida de sólidos a través del efluente de la depuradora. Por otra parte, deben tomarse precauciones especiales para evitar errores debidos a la variación en la cantidad de lodo presente en el sedimentador.

▼M4

6. Las unidades se hacen funcionar bajo cada conjunto seleccionado de condiciones y, una vez alcanzado el equilibrio, se obtienen a lo largo de unas tres semanas las concentraciones medias de la sustancia problema en el estado de equilibrio en los efluentes y, de forma optativa, los valores de COD. Además de evaluar el porcentaje de eliminación de la sustancia problema y, opcionalmente, del COD, debe expresarse de forma gráfica la relación entre las condiciones de funcionamiento de la instalación y la concentración en el efluente. A partir de aquí pueden calcularse constantes cinéticas orientativas y es posible predecir bajo qué condiciones podrá depurarse la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Son aplicables los puntos 12 y 13 del capítulo C.10-A.

UMBRALES

8. Son aplicables los puntos 14 y 15 del capítulo C.10-A.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

9. Es aplicable el punto 16 del capítulo C.10-A.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

10. Son aplicables los puntos 17 y 18 del capítulo C.10-A.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

11. Una unidad adecuada es la consituida por el sistema del depósito poroso modificado (apéndice 6.1). Consiste en un recipiente interior (o revestimiento) hecho de polipropileno poroso de 3,2 mm de espesor y un diámetro de poro de unos 90 μm, con la junta soldada a tope (de esta manera, la unidad es más sólida que la descrita en el punto 21 del presente capítulo, C.10 A). El revestimiento se introduce en un recipiente exterior de polietileno impermeable, que consiste en dos partes: una base circular en la que se perforan agujeros para alojar dos tubos de aire y un tubo de retirada de lodo, y un cilindro superior que se atornilla a la base y que tiene una salida situada de forma que pase un volumen conocido (3 l) al recipiente del depósito poroso. Uno de los tubos de aire está provisto de una piedra difusora y el otro tiene el extremo abierto y está colocado en ángulo recto respecto a la piedra del depósito. Este sistema produce la turbulencia necesaria para garantizar que el contenido del depósito se mezcla completamente, y que la concentración de oxígeno disuelto es > 2 mg/l.

12. Se mantiene el número adecuado de unidades a una temperatura controlada en el rango de 5 a 20 °C (± 1 °C), bien en baño de agua o bien en salas de temperatura constante. Se requieren bombas que introduzcan en los recipientes de aireación la solución de la sustancia problema y el lodo sedimentado, al caudal necesario (0-1,0 ml/min y 0-25 ml/min, respectivamente), y una tercera bomba que elimine el lodo residual de los recipientes de aireación. El caudal necesario, que debe ser muy bajo, de lodo residual se consigue con una bomba regulada a un caudal superior y que funcione de forma intermitente por medio de un temporizador que la active, por ejemplo, durante 10 s cada minuto, si el caudal de la bomba es de 3 ml/min, lo que da un caudal de retirada de lodo de 0,5 ml/min.

Equipo de filtración o centrífuga

13. Es aplicable el punto 23 del capítulo C10-A.

Equipo analítico

14. Es aplicable el punto 24 del capítulo C.10-A.

Agua

▼M4

15. Son aplicables los puntos 25 y 26 del capítulo C.10-A.

Medio orgánico

16. Es aplicable el punto 27 del capítulo C.10-A.

Agua residual sintética

17. Es aplicable el punto 28 del capítulo C.10-A.

Agua residual doméstica

18. Es aplicable el punto 29 del capítulo C.10-A.

Lodo activado

19. Es aplicable el punto 30 del capítulo C10-A.

Soluciones madre de sustancia problema

20. Son aplicables los puntos 31 y 32 del capítulo C.10-A.

PROCEDIMIENTO

Preparación del inóculo

21. Es aplicable solamente el punto 34 del capítulo C.10-A. Utilícese lodo activado (con una concentración en torno a 2,5 g/l).

Número de unidades de ensayo

22. Para un ensayo sencillo, es decir, para medir el porcentaje de eliminación, solo se necesita un único TRL, pero para conseguir los datos necesarios para calcular las constantes cinéticas orientativas hacen falta 4 o 5 valores de TRL. Generalmente se eligen valores de entre 2 y 10 días. En la práctica, es conveniente efectuar el ensayo con 4 o 5 TRL simultáneamente a una única temperatura; en estudios ampliados se utilizan los mismos valores de TRL, o quizá una gama diferente de valores, pero a otras temperaturas en el rango de 5 a 20 °C. Para la degradación primaria (uso principal), normalmente solo es necesaria una unidad por conjunto de condiciones. Sin embargo, para estudiar la biodegradabilidad final hay que disponer de una unidad de control, con cada conjunto de condiciones, que reciba el agua residual pero no la sustancia problema. Si se piensa que la sustancia problema se encuentra en el agua residual utilizada, será necesario utilizar unidades de control cuando se haga la evaluación de la biodegradación primaria, y aplicar las correcciones pertinentes en los cálculos.

Introducción del medio orgánico y de la sustancia problema

23. Aplíquense los puntos 36 a 39 del capítulo C.10-A, pero obsérvese que la solución de sustancia problema se introduce aparte y que se utilizan diversas proporciones de retirada de lodo. Debe procederse a medir y ajustar, en caso necesario, en una banda de ± 10 %, los caudales de los afluentes, efluentes y lodo retirado, con frecuencia, por ejemplo, dos veces al día. Si se encuentran dificultades en los métodos analíticos cuando se utiliza agua residual doméstica, efectúese el ensayo con agua residual sintética, pero asegurándose de que los medios diferentes proporcionan datos cinéticos comparables.

Manipulación de las unidades de lodo activado

24. Son aplicables los puntos 40 a 43 del capítulo C.10-A, pero hay que controlar el TRL solamente por medio de la retirada "constante" de lodo.

Muestreo y análisis

25. Son aplicables los puntos 44 a 50 del capítulo C.10-A, salvo que aquí debe determinarse la concentración de la sustancia problema y es opcional la determinación del COD; no debe utilizarse la DQO.

▼M4

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

26. Son aplicables los puntos 52 a 54 del capítulo C.10-A.

Expresión de los resultados del ensayo

27. Son aplicables los puntos 56 a 62 del capítulo C.10-A.

Cálculo de las constantes cinéticas

28. Es más realista indicar la concentración media de la sustancia problema en el estado de equilibrio en el efluente y describir cómo varía en función de las condiciones de funcionamiento de la instalación, en lugar de indicar el porcentaje de biodegradación primaria. Puede hacerse atendiendo a la ecuación (6) del apéndice 6.2, con la que se pueden obtener valores de K_S, μ_m y θ_{SC}, que es el tiempo crítico de retención de lodo.

[Otra posibilidad consiste en obtener valores aproximados de K_S y μm utilizando un sencillo programa informático para ajustar a los valores experimentales obtenidos la curva teórica calculada a partir de la ecuación 2 (apéndice 6.2). Aunque las eventuales soluciones dadas no serán únicas, puede obtenerse una aproximación razonable de K_S y μ_m].

Variabilidad de los resultados

29. Es una experiencia común obtener valores variables de los parámetros cinéticos para las distintas sustancias. Se piensa que en los valores resultantes influyen mucho las condiciones en las que se ha formado el lodo, así como las condiciones reinantes durante el ensayo efectuado (como en el punto 5 y en otros ensayos). Grady *et al.* (4) han discutido un aspecto de esta variabilidad y han sugerido que los términos "existente" e "intrínseca" deben aplicarse a dos situaciones extremas que representan los límites del estado fisiológico que un cultivo puede alcanzar durante un experimento cinético. Si no se permite que cambie el estado durante el ensayo, los valores de los parámetros cinéticos reflejan las condiciones del ambiente del que se han tomado los microorganismos; estos valores se denominan "existentes" o presentes en el momento. Al otro extremo, si las condiciones del ensayo son tales que permiten el pleno desarrollo del sistema de síntesis de proteínas y así alcanzar la tasa de crecimiento más elevada posible, los parámetros cinéticos obtenidos se denominan "intrínsecos", y solo dependen de la naturaleza del sustrato y de los tipos de bacterias del cultivo. Como referencia, se obtendrán valores existentes manteniendo baja la proporción de concentración del sustrato respecto a los microorganismos competentes (S_o/X_o), por ejemplo 0,025, y los valores intrínsecos aparecen cuando la proporción es elevada, es decir, de al menos 20. En ambos casos, S_o debe igualar o superar al valor pertinente de Ks, la constante de semisaturación.

30. En un reciente taller de la SETAC (5) se discutieron la variabilidad y otras facetas de la cinética de la biodegradación. De tales estudios, tanto de los ya publicados como de los que aún están en fase de proyecto, debe obtenerse una visión más clara de la cinética de las depuradoras, a fin de permitir una mejor interpretación de los datos disponibles, y para sugerir mejoras de los futuros métodos de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornadas Com. Español. Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

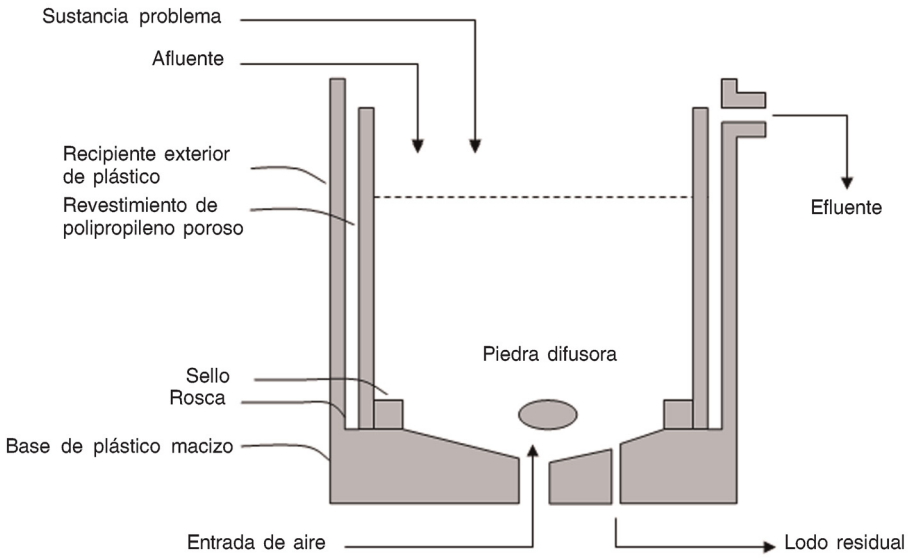
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Apéndice 6.1

Depósito poroso con control del TRL



▼M4

Apéndice 6.2

Cálculo de las constantes cinéticas

1. Aceptando que se aplica la cinética de Monod y considerando un balance de masas de sólidos activos y de sustrato en todo el sistema de lodo activado (1), pueden obtenerse las siguientes expresiones del estado de equilibrio:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

o

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

donde:

S_1 = concentración de sustrato en el efluente (mg/l)

K_S = constante de semisaturación, concentración a la que $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = tasa de crecimiento específico (d^{-1})

μ_m = valor máximo de μ_m (d^{-1})

K_d = tasa de degradación específica de los sólidos activos (d^{-1})

θ_S = tiempo medio de retención del lodo, TRL (d)

Del examen de esta ecuación se deducen las conclusiones siguientes:

i) la concentración del efluente es independiente de la del afluente (S_0); por tanto, el porcentaje de biodegradación varía con la concentración del afluente, S_0,

ii) el único parámetro de control de la instalación que afecta a S_1 es el tiempo de retención del lodo, θ_S,

iii) para una concentración dada en el afluente, S_0, habrá un tiempo crítico de retención del lodo tal que:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

donde:

θ_{SC} = tiempo crítico de retención del lodo, por debajo del cual los microorganismos competentes serán arrastrados fuera de la instalación,

iv) dado que los demás parámetros de la ecuación (2) están asociados con la cinética de crecimiento, es probable que la temperatura afecte al nivel del sustrato del efluente y a la edad crítica del lodo, es decir, el tiempo de retención del lodo necesario para obtener cierto grado de depuración aumentará según descienda la temperatura.

2. A partir del balance de masas de sólidos en el sistema del depósito poroso, y aceptando que la concentración de sólidos en el efluente de la instalación, X_2, es baja respecto a la del recipiente de aireación, X_1, el tiempo de retención del lodo es:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

y

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

donde:

V = volumen del recipiente de aireación (l)

X_1 = concentración de sólidos en el recipiente de aireación (mg/l)

X_2 = concentración de sólidos en el efluente (mg/l)

Q_0 = caudal del afluente (l/d)

Q_1 = caudal del lodo residual (l/d).

Así pues, es posible fijar el tiempo de retención del lodo a cualquier valor preseleccionado mediante el control del caudal del lodo residual, Q_1.

Conclusiones:

3. En consecuencia, el objetivo principal del ensayo consiste en poder prever la concentración del efluente y, por tanto, los niveles de sustancia problema en las aguas receptoras.

4. Mediante la representación gráfica de S_1 frente a θ_S, a veces puede evaluarse fácilmente el tiempo crítico de retención del lodo, θ_{SC}; véase por ejemplo la curva 3 de la figura 1. Cuando esto no es posible, se puede calcular θ_{SC}, junto con los valores aproximados de μ_m y K_S, representando S_1 frente a $S_1 \bullet \theta_S$.

Una reordenación de la ecuación (1) da el resultado siguiente:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Si K_d es pequeña, entonces $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ y [5] se convierte en lo siguiente:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Así pues, la gráfica deberá ser una línea recta (véase la figura 2) de pendiente $1/\mu_m$ y ordenada en el origen K_S/μ_m; también $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Tres temperaturas; cinco TRL

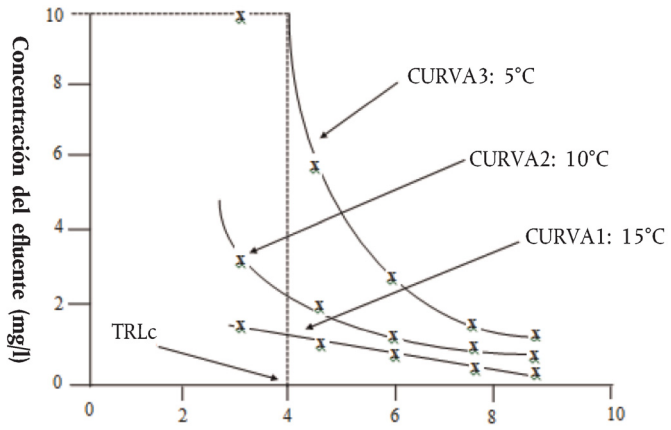
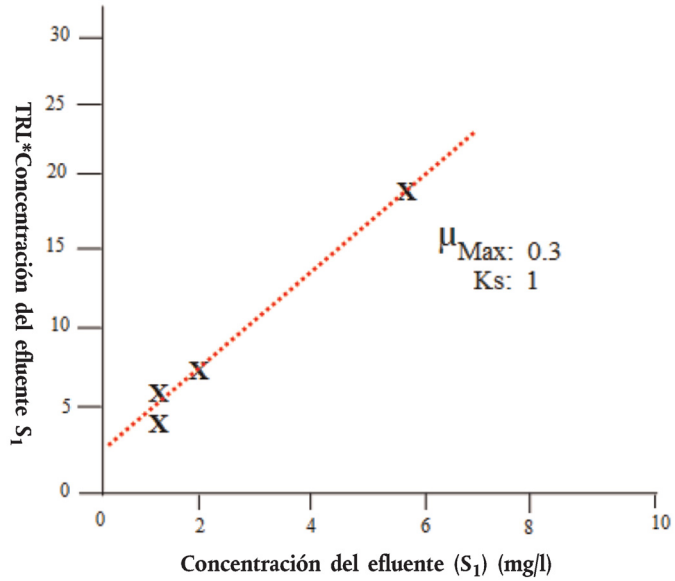


Figura 2

Recta de regresión TRL · S_1 frente a S_1 a T = 5 °C



Glosario:

TRL

Concentración del efluente

▼M4

Apéndice 7

ENSAYO CON UN RANGO DE CONCENTRACIONES BAJAS (µg/l)

1. En el medio acuático suele haber muchas sustancias presentes, incluso en las aguas residuales, a concentraciones muy bajas (µg/l). A tales concentraciones, no es probable que sirvan de sustratos primarios que permitan el crecimiento, pero es más probable que se degraden como sustratos secundarios, no responsables del crecimiento, en paralelo con otras diversas sustancias carbonadas presentes de forma natural. Por tanto, la degradación de tales sustancias no se ajustará al modelo descrito en el apéndice 6. Hay muchos modelos que podrían aplicarse y, bajo las condiciones reinantes en los sistemas de depuración de aguas residuales, podrían estar operativos simultáneamente más de uno. Es mucha la investigación que ha de hacerse todavía para poder resolver este problema.

2. Mientras tanto, puede seguirse el procedimiento indicado en el texto principal (capítulo C.10-A), pero solo en relación con la biodegradabilidad primaria, utilizando concentraciones suficientemente bajas (< 100 µg/l) y un procedimiento analítico validado. Puede calcularse el porcentaje de biodegradación (véase el punto 54 del método de ensayo) siempre que se tengan en cuenta los eventuales procesos abióticos (adsorción, volatilidad, etc.). Puede citarse como ejemplo el estudio de Nyholm y sus asociados (1) (2), con un ciclo de 4 h en un sistema de llenado y recogida. Calcularon constantes de pseudoprimer orden respecto a 5 sustancias añadidas a un agua residual a concentraciones entre 5 y 100 µg/l. Para la biodegradabilidad final, pueden utilizarse sustancias marcadas con ^{14}C. Queda fuera del ámbito del presente método de ensayo recoger una descripción de esta posibilidad, ya que por ahora no se dispone de procedimientos aprobados, aunque un método propuesto para la norma ISO 14592 (3) contiene orientaciones sobre el uso de sustancias marcadas con ^{14}C.

Prueba LASC

3. Después se propuso un ensayo más simple en dos etapas (4) (5) (6); el método del lodo activado semicontinuo (LASC) va seguido por ensayos cinéticos a corto plazo con muestras tomadas de las unidades de LASC. El sistema LASC funciona con tasas conocidas de retirada de lodo (a diferencia del método de ensayo C.12 original) y se alimenta con agua residual sintética de la OCDE modificada o con agua residual doméstica. El agua residual sintética se modificó (debido a que el valor de pH variaba y a que la capacidad de sedimentación del lodo era baja) por la adición de fosfato como amortiguador, extracto de levadura, cloruro de hierro (III) y sales de oligoelementos, y se aumentó su DQO hasta alrededor de 750 mg/l por la elevación de la concentración de peptona y extracto de carne. Las unidades funcionaban en ciclos de 24 h: aireación durante 23 h, retirada del lodo, sedimentación, retirada del sobrenadante (efluente) seguida de la adición del agua residual sintética más la sustancia problema, hasta 100 µg/l, (es decir, a la misma concentración aproximadamente que en el ensayo a corto plazo). Una vez por semana, el 10 % del lodo total se sustituye con lodo nuevo a fin de mantener la población microbiana en equilibrio.

4. Se miden las concentraciones de la sustancia problema al inicio y al final de la aireación, y el ensayo prosigue hasta que se estabilice la eliminación de la sustancia problema; esto puede necesitar desde una semana hasta varios meses.

Ensayo a corto plazo

5. Se lleva a cabo un ensayo a corto plazo (por ejemplo, 8 horas) para determinar la constante cinética de velocidad de (pseudo) primer orden de la degradación de la sustancia problema en lodo activado de orígenes e historiales conocidos pero diferentes. En particular, se toman muestras de lodo de los reactores LASC —al final de un período de aireación cuando la concentración de sustrato orgánico es baja— durante la realización de un experimento de aclimatación (puntos 3, 4). También puede tomarse lodo de una

▼M4

unidad
paralela de LASC no expuesta a la sustancia problema, con fines comparativos. Se airean las mezclas de lodo y de sustancia problema añadida a dos o más concentraciones en el rango de 1-50 µg/l, sin adición de agua residual sintética ni otro sustrato orgánico. Se determina el contenido de sustancia problema que queda en disolución a intervalos periódicos como, por ejemplo, cada hora, en función de la degradabilidad de la sustancia, durante no más de 24 h. Se centrifugan las muestras antes de someterlas a un análisis adecuado.

Cálculos

6. Los datos de las unidades LASC se utilizan para calcular el porcentaje de eliminación de la sustancia problema (punto 54). Asimismo es posible calcular la constante media de velocidad, K_1, (normalizada para tener en cuenta la concentración de sólidos en suspensión) con ayuda de la ecuación siguiente:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

donde:

t = tiempo de aireación (23 h)

C_e = concentración al final del período de aireación (µg/l)

C_i = concentración al inicio de la aireación (µg/l)

SS = concentración de sólidos en el lodo activado (mg/l)

7. En el ensayo a corto plazo, se representa frente al tiempo el log del porcentaje de la concentración restante, y la pendiente de la parte inicial (degradación del 10-50 %) de la gráfica es equivalente a K_1, la constante de (pseudo) primer orden. La constante se normaliza respecto a la concentración de sólidos en el lodo dividiendo la pendiente por la concentración de sólidos en el lodo. El resultado comunicado debe incluir asimismo datos de las concentraciones iniciales de la sustancia problema y de los sólidos en suspensión, tiempo de retención del lodo, carga y origen del lodo, así como datos de la eventual exposición previa a la sustancia problema.

Variabilidad de los resultados

8. En un reciente taller de la SETAC (7) se discutieron la variabilidad y otras facetas de la cinética de la biodegradación. De tales estudios, tanto de los ya publicados como de los que aún están en fase de proyecto, debe obtenerse una visión más clara de la cinética de las depuradoras, a fin de permitir una mejor interpretación de los datos disponibles, y para sugerir mejoras de los futuros métodos de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de compuestos orgánicos a baja concentración en el agua.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and estándar (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biopelículas

INTRODUCCIÓN

1. Los ensayos de simulación se aplican normalmente a sustancias que no han superado un ensayo exploratorio de la biodegradabilidad fácil [(capítulo C.4-A a F del presente anexo (9)], pero sí han pasado un ensayo de biodegradabilidad intrínseca. Con carácter excepcional, también se aplican los ensayos de simulación a cualquier sustancia de la que se requiera más información, especialmente sustancias comercializadas en grandes cantidades, y normalmente se aplica el ensayo del lodo activado (C.10-A). Sin embargo, en ciertas circunstancias, es necesario conseguir información específica relativa al comportamiento de una sustancia ante métodos de depuración de aguas residuales con participación de biopelículas: filtros percoladores o por goteo, biodiscos giratorios, lechos fluidizados. Se han diseñado diversos dispositivos para satisfacer esta necesidad.

2. Gerike *et al.* (1) han utilizado grandes filtros por goteo de laboratorio, en modo de acoplamiento. Estos filtros ocupaban mucho espacio y necsitaban volúmenes relativamente grandes de agua residual natural o sintética. Truesdale *et al.* (2) han descrito filtros más pequeños (6 pies × 6 pulgadas de diámetro) que aceptaban aguas residuales naturales exentas de agentes tensioactivos, pero seguían necesitando volúmenes bastante grandes. Para que se formara una biopelícula "madura" hacían falta hasta 14 semanas, y se necesitaba un plazo adicional de 4-8 semanas tras la primera introducción del agente tensioactivo antes de que se realizara la aclimatación.

3. Baumann *et al.* (3) han desarrollado un filtro mucho más pequeño utilizando "lana" de poliéster previamente remojada en lodo activado como medio inerte de soporte de la biopelícula. Se utilizaba como única fuente de carbono la sustancia problema, y se evaluaba la biodegradabilidad a partir de mediciones del carbono orgánico disuelto (COD) en el afluente y en el efluente, y de la cantidad de CO_2 en el gas de salida.

4. Gloyna *et al.* (4), aplicando un enfoque bastante diferente, inventaron el reactor tubular giratorio. Sobre la superficie interna del tubo giratorio se cultivaba una biopelícula sobre un área conocida pasando el afluente introducido por la parte superior del tubo, que se encontraba inclinado ligeramente respecto a la horizontal. Este reactor se ha utilizado para estudiar la biodegradabilidad de los tensioactivos (5), y también para investigar el espesor óptimo de la biopelícula y la difusión a través de la película (6). Estos últimos autores han seguido desarrollando el reactor, incluso modificándolo para que pueda determinarse el CO_2 en el gas de salida.

5. El Standing Committee of Analysts (Comité Permanente de Analistas del Reino Unido) ha adoptado el reactor tubular giratorio como método normal para evaluar tanto la biodegradabilidad de las sustancias (7) como la posibilidad de tratar las aguas residuales y su toxicidad (8). El método aquí descrito reúne las ventajas de ser simple, compacto y reproducible y de necesitar un volumen relativamente reducido de medio orgánico.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. A la superficie interna de un tubo inclinado que gira lentamente se aplica agua residual sintética o doméstica, y la sustancia problema, mezclada o sola. En esa superficie interna se forma una capa de microorganismos, similar a las presentes en los medios de los biofiltros. Las condiciones de trabajo del reactor se eligen de manera que permitan la eliminación adecuada de la materia orgánica y, cuando sea necesario, la oxidación del amonio.

▼M4

7. Se recoge el efluente del tubo y se sedimenta y/o se filtra antes de analizarlo para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) y/o la de la sustancia problema mediante un método específico. Con fines comparativos, se hacen funcionar en paralelo y bajo las mismas condiciones unidades de control sin sustancia problema. Se acepta que la diferencia entre las concentraciones de COD en los efluentes de las unidades de ensayo y de control se debe a la sustancia problema y a sus metabolitos orgánicos. Para calcular la eliminación de la sustancia problema, se compara esta diferencia con la concentración de la sustancia problema añadida (como COD).

8. Normalmente puede distinguirse la biodegradación de la bioadsorción examinando atentamente la curva de la eliminación frente al tiempo. Generalmente puede confirmarse aplicando el ensayo de biodegradación fácil (consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono) con un inóculo aclimatado, tomado al final del ensayo de los reactores que reciben la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

9. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados.

10. Normalmente no es posible hacer el ensayo con sustancias volátiles y poco solubles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el apéndice 5 del capítulo C.10-A). También debe conocerse la estructura química, o al menos la fórmula empírica, para poder calcular los valores teóricos o comprobar los valores medidos de ciertos parámetros, como la demanda teórica de oxígeno (DTO) o el COD.

11. El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos (véase el apéndice 4 del capítulo C.10-A) puede ser útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de biodegradación.

UMBRALES

12. Originalmente se exigía que la biodegradación primaria de tensioactivos llegara como mínimo al 80 % para poder comercializar la sustancia. Si no se alcanza el valor del 80 %, puede aplicarse este ensayo (confirmatorio) de simulación y el tensioactivo puede comercializarse solamente si se elimina más del 90 % de la sustancia específica. Con las sustancias en general, no se trata de pasar un umbral sino de que el valor de eliminación porcentual pueda utilizarse para calcular aproximadamente la concentración probable en el medio ambiente que deba utilizarse en la evaluación del peligro planteado por las sustancias. En una serie de estudios de sustancias puras, se observó que el porcentaje de eliminación del COD era > 90 % en más de las tres cuartas partes, y > 80 % en más del 90 %, de las sustancias que mostraban un grado significativo de biodegradabilidad.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

13. Para asegurarse de la correcta ejecución del procedimiento experimental, es conveniente someter ocasionalmente a ensayo sustancias de referencia cuyo comportamiento se conozca. Entre esas sustancias se cuentan el ácido adípico, el 2-fenil-fenol, el 1-naftol, el ácido difénico y el ácido 1-naftoico.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

14. Un laboratorio del Reino Unido dedujo que la desviación típica relativa era del 3,5 % dentro de un ensayo y del 5 % entre ensayos (7).

▼M4

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

Reactores tubulares giratorios

15. El dispositivo (véanse las figuras 1 y 2 del apéndice 8) consiste en un banco de tubos acrílicos, cada uno de los cuales mide 30,5 cm de longitud y 5 cm de diámetro interior, apoyado en ruedas con borde de caucho, con un marco metálico de soporte. Cada tubo tiene una pestaña exterior, de unos 0,5 cm de profundidad, para mantenerlo sobre las ruedas, la superficie interior se ha hecho rugosa con lana de acero basta, y hay una pestaña interior de 0,5 cm de profundidad en el extremo superior (de alimentación) para retener el líquido. Los tubos presentan una inclinación de un grado aproximadamente respecto a la horizontal para conseguir el tiempo de contacto necesario cuando se aplica el medio de ensayo a un tubo limpio. Las ruedas con borde de caucho se hacen girar mediante un motor de velocidad lenta y variable. La temperatura de los tubos está controlada por su instalación en una zona de temperatura constante.

16. Si se encierra cada reactor de tubos dentro de un tubo taponado, ligeramente mayor, y se vela por que las conexiones sean estancas, es posible recoger el CO_2 de salida en una solución alcalina para su medición posterior (6).

17. En un recipiente de almacenamiento de 20 l se pone el suministro de 24 h, para cada tubo, de medio orgánico con la sustancia problema añadida, en su caso (A) (véase la figura 2). Cuando sea necesario, se podrá añadir aparte la solución de la sustancia problema. Cerca del fondo de cada recipiente de almacenamiento hay una salida conectada mediante los tubos adecuados (por ejemplo, de caucho de silicona) a través de una bomba peristáltica a un tubo de alimentación acrílico o de vidrio que se introduce 2-4 cm en el extremo superior (alimentación) del tubo inclinado (C). Se deja que el efluente gotee desde el extremo inferior del tubo inclinado para recogerse en otro recipiente de almacenamiento (D). El efluente se somete a sedimentación o filtración antes de proceder a su análisis.

Equipo de filtración y centrífuga

18. Dispositivo de filtración de muestras con filtros de membrana de porosidad adecuada (diámetro de abertura nominal de 0,45 μm) que adsorban sustancias orgánicas solubles o liberen carbono orgánico en un grado mínimo. Si se utilizan filtros que liberan carbono orgánico, lavarlos cuidadosamente con agua caliente para eliminar el carbono orgánico lixiviable. Otra posibilidad es utilizar una centrífuga que pueda alcanzar una aceleración de 40 000 m/s^2.

19. Equipo analítico para determinar:

— el COD, el carbono orgánico total (COT), o la demanda química de oxígeno (DQO),

— la sustancia específica (por HPLC, CG, etc.), cuando sea necesario,

— pH, temperatura, acidez, alcalinidad,

— amonio, nitrito y nitrato, si los ensayos se efectúan en condiciones de nitrificación.

Agua

20. Agua del grifo, con menos de 3 mg/l de COD.

21. Agua destilada o desionizada, con menos de 2 mg/l de COD.

▼M4

Medio orgánico

22. Como medio orgánico puede utilizarse agua residual sintética, agua residual doméstica o una mezcla de ambos tipos. Se ha observado que el uso de agua residual doméstica sola suele llevar a un mayor porcentaje de eliminación del COD (en las unidades de lodo activado) y que incluso permite la biodegradación de algunas sustancias que no se biodegradan cuando se utiliza el agua residual sintética de la OCDE. Así pues, se recomienda el uso de agua residual doméstica. Debe medirse la concentración de COD (o de DQO) en cada nuevo lote de medio orgánico. Es necesario conocer la acidez o la alcalinidad del medio orgánico. Es posible que el medio orgánico requiera la adición de un amortiguador adecuado (carbonato de hidrógeno y sodio, o fosfato de hidrógeno y potasio) si es baja su acidez o su alcalinidad, para mantener durante el ensayo un pH de alrededor de 7,5 ± 0,5 en el reactor. Debe decidirse en cada caso la cantidad de amortiguador que ha de añadirse, y en qué momento hacerlo.

Agua residual sintética

23. Disuélvase en cada litro de agua del grifo: peptona, 160 mg; extracto de carne, 110 mg; urea, 30 mg; fosfato de hidrógeno y dipotasio anhidro (K_2HPO_4), 28 mg; cloruro de sodio (NaCl), 7 mg; cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$), 2 mg. El agua residual sintética de la OCDE es un ejemplo y da una concentración media de COD en el afluente de unos 100 mg/l. También es posible utilizar otras composiciones, con la misma concentración aproximada de COD, que se acerquen más al agua residual real. El agua residual sintética puede elaborarse con agua destilada en forma concentrada y conservarse a alrededor de 1 °C durante una semana como máximo. En el momento en que se necesite, se diluye con agua del grifo. (Este medio no es satisfactorio: la concentración de nitrógeno es muy elevada y el contenido de carbono es relativamente bajo, por ejemplo, pero no se ha sugerido nada mejor, salvo añadir más fosfato como amortiguador y peptona adicional.)

Agua residual doméstica

24. Debe utilizarse agua residual recién decantada, recogida cada día en una depuradora que reciba predominantemente agua residual doméstica. Debe recogerse del canal del rebosadero del tanque de sedimentación primaria, o de la alimentación a la instalación de lodo activado, y encontrarse exenta en gran medida de partículas gruesas. El agua residual puede seguir utilizándose tras guardarse varios días a unos 4 °C, si se demuestra que el COD (o la DQO) no ha descendido de forma significativa (es decir, en menos del 20 %) en ese plazo. A fin de limitar las perturbaciones del sistema, el COD (o la DQO) de cada lote nuevo debe ajustarse a un nivel constante adecuado, antes de utilizarlo, por ejemplo, mediante dilución con agua del grifo.

Lubricante

25. Puede aplicarse glicerol o aceite de oliva para lubricar los rodillos de la bomba peristáltica: ambos productos son adecuados para utilizarse con tubos de caucho de silicona.

Soluciones madre de sustancia problema

26. Con sustancias de solubilidad adecuada, preparar soluciones madre a concentraciones apropiadas (por ejemplo, de 1 a 5 g/l) en agua desionizada, o en la porción mineral del agua residual sintética. Respecto a las sustancias insolubles, véase el apéndice 5 del capítulo C.10-A. Este método no es adecuado para las sustancias volátiles si no se modifican los reactores tubulares (punto 16). Hay que determinar el COD y el COT de la solución madre y repetir las mediciones con cada lote nuevo. Si la diferencia entre el COD y el COT es superior al 20 %, ha de comprobarse la hidrosolubilidad de la sustancia problema. Comparar con los valores nominales el COD o la

▼M4

concentración de la sustancia problema medida por análisis específico de la solución madre, para considerar si la recuperación es suficientemente buena (normalmente puede esperarse > 90 %). Ha de evaluarse, especialmente en el caso de las dispersiones, si el COD puede utilizarse como parámetro analítico o si solo es posible utilizar una técnica analítica específica de la sustancia problema. En el caso de las dispersiones es necesario centrifugar las muestras. Con cada lote nuevo hay que medir el COD, la DQO o la sustancia mediante análisis específico.

27. Determínese el pH de la solución madre. La presencia de valores extremos indica que la adición de la sustancia puede influir en el pH de lodo activado en el sistema de ensayo. En este caso, haya que neutralizar la solución madre para obtener un pH de 7 ± 0,5, utilizando pequeñas cantidades de ácidos o bases inorgánicos, pero evitando la precipitación de la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO

Preparación del medio orgánico para su introducción

28. Hay que asegurarse de que todos los recipientes del afluente y del efluente, así como los tubos que los unen, se limpian a fondo para eliminar la eventual proliferación microbiana, tanto al principio como a lo largo del ensayo.

29. Prepárese el agua residual sintética (punto 23) cada día de nuevo, bien a partir de los sólidos o bien a partir de la solución madre concentrada mediante la dilución adecuada con agua del grifo. Mídase la cantidad necesaria con una probeta y añádase a un recipiente de afluente limpio. También, cuando sea necesario, añádase al agua residual sintética, antes de la dilución, la cantidad necesaria de solución madre de la sustancia problema o de la sustancia de referencia. Si es más conveniente o necesario para evitar pérdidas de la sustancia problema, prepárese una solución diluida aparte de la sustancia problema en un depósito aparte y añádase a los tubos inclinados mediante una bomba dosificadora diferente.

30. Otra posibilidad, preferible, es utilizar agua residual doméstica decantada (punto 24), recogida de nuevo cada día, cuando sea posible.

Funcionamiento de los reactores tubulares giratorios

31. Para la evaluación de una sola sustancia problema, hacen falta dos reactores tubulares idénticos montados en una sala de temperatura constante, normalmente a 22 ± 2 °C.

32. Ajústense las bombas peristálticas para que lleven un caudal de 250 ± 25 ml/h de medio orgánico (sin la sustancia problema) a los tubos inclinados, que giran a 18 ± 2 rpm. Aplíquese el lubricante (punto 25) a los tubos de la bomba al inicio y periódicamente a lo largo del ensayo, para conseguir un funcionamiento adecuado y prolongar la vida de los tubos.

33. Ajústese el ángulo de inclinación de los tubos respecto a la horizontal para conseguir un tiempo de residencia de 125 ± 12,5 s de la alimentación en un tubo limpio. Estímese el tiempo de retención añadiendo a la alimentación un marcador no biológico (por ejemplo, NaCl, un colorante inerte): se acepta que el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima en el efluente es el tiempo medio de retención (cuando la película es máxima, el tiempo de retención puede aumentar hasta unos 30 min).

34. Se ha comprobado que estas tasas, velocidades y tiempos proporcionan retiradas adecuadas (> 80 %) del COD (o de la DQO) y producen efluentes nitrificados. La velocidad de flujo debe modificarse si la eliminación es insuficiente o si ha de simularse el comportamiento de una depuradora particular. En este último caso, ajústese la proporción de medio orgánico introducido hasta que el comportamiento del reactor se alinee con el de la depuradora.

▼M4

Inoculación

35. La inoculación aérea puede ser suficiente para iniciar el crecimiento de los microorganismos cuando se utiliza agua residual sintética; en caso contrario, añádase a la alimentación durante 3 días 1 ml/l de agua residual decantada.

Mediciones

36. A intervalos periódicos, compruébese que las dosis de introducción de material y velocidades de giro se ajustan a los límites requeridos. Asimismo, mídase el pH del efluente, especialmente si se espera que haya nitrificación.

Muestreo y análisis

37. El método, la pauta y la frecuencia del muestreo deben elegirse de manera que se ajusten al propósito del ensayo. Por ejemplo, tómense muestras instantáneas de afluente y de efluente, o bien recójanse muestras a lo largo de un período más largo (por ejemplo, de 3 a 6 h). En el primer período, sin sustancia problema, tómense muestras dos veces por semana. Fíltrense las muestras por membrana o centrifúguense a alrededor de 40 000 m/s^2 durante unos 15 min (punto 18). Puede ser necesario sedimentar las muestras y/o pasarlas por un filtro grueso antes de proceder a la filtración por membrana. Determínese el COD (o la DQO) al menos por duplicado y, en caso necesario, la DBO y el contenido de amonio y de nitrito/nitrato.

38. Todos los análisis deben efectuarse lo antes posible tras la recogida y preparación de las muestras. Si resulta necesario retrasar un análisis, las muestras deben conservarse a unos 4 °C a oscuras, en frascos llenos y bien cerrados. Si es necesario almacenar las muestras durante más de 48 h, hay que conservarlas por congelación, por acidificación o por adición de una sustancia tóxica adecuada [por ejemplo, 20 ml/l de una solución de cloruro de mercurio (II) de 10 g/l]. Hay que verificar que la técnica de conservación no altera los resultados de los análisis.

Período de rodaje

39. En este período, la biopelícula superficial crece hasta alcanzar un espesor óptimo, lo que generalmente necesita unas 2 semanas y no debe superar las 6 semanas. La eliminación de COD (o de DQO) (punto 44) va aumentando hasta alcanzar un valor de meseta. Una vez alcanzada la meseta con un valor similar en ambos tubos, se selecciona uno de ellos como control para el resto del ensayo, durante el cual su comportamiento debe mantenerse constante.

Introducción de la sustancia problema

40. Añádase en este momento la sustancia problema al otro reactor, a la concentración requerida, generalmente de 10 a 20 mg C/l. El control sigue recibiendo solamente el medio orgánico.

Período de aclimatación

41. Continúese haciendo los análisis del COD (o de la DQO) dos veces por semana y, si hay que evaluar la biodegradabilidad primaria, mídase también la concentración de la sustancia problema mediante un análisis específico. Déjese de 1 a 6 semanas (o incluso más en condiciones especiales) una vez añadida por primera vez la sustancia problema, para permitir que se dé la aclimatación. Cuando el porcentaje de eliminación (puntos 43 a 45) alcance el valor máximo, obténganse de 12 a 15 valores válidos en la fase de meseta a lo largo de unas 3 semanas, para evaluar el porcentaje medio de eliminación. Se considera que el ensayo está completado si se alcanza un nivel suficientemente elevado de eliminación. Normalmente, no debe llegarse a una duración del ensayo superior a 12 semanas tras la primera adición de la sustancia problema.

▼M4

Arranque de la película

42. A intervalos relativamente periódicos, se produce la brusca eliminación de grandes cantidades del excedente de película de los tubos, o "arranque". Para garantizar que esto no afecta a la comparabilidad de los resultados, permítase que los ensayos abarquen al menos dos ciclos completos de crecimiento y de arranque.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

43. Calcúlese el porcentaje de eliminación de la sustancia problema en términos de COD (o de DQO) respecto a cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

donde:

D_t = porcentaje de eliminación del COD (o de la DQO) al tiempo t,

Cs = concentración de COD (o DQO) en el afluente debida a la sustancia problema, de preferencia estimada a partir de la concentración en la solución madre y del volumen añadido de esta (mg/l),

E = valores de COD (o DQO) medidos en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l),

Eo = valores de COD (o DQO) medidos en el efluente de control al tiempo t (mg/l).

Repítase el cálculo con la eventual sustancia de referencia utilizada.

Comportamiento del reactor de control

44. El grado de eliminación del COD (o de la DQO) (D_B) del medio orgánico en los reactores de control es un dato útil para evaluar la actividad de biodegradación de la biopelícula durante el ensayo. Calcúlese el porcentaje de eliminación con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

donde:

Cm = valores de COD (o de DQO) del medio orgánico en el afluente de control (mg/l).

45. Calcúlese la eliminación (D_{ST}) de la sustancia problema si se mide con un método analítico específico en cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

donde:

Si = concentración medida o, de preferencia, estimada de la sustancia problema en el afluente de ensayo (mg/l),

Se = concentración medida de la sustancia problema en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l).

▼M4

Si el método analítico da un valor positivo en el agua residual no modificada equivalente a S_e mg/l, calcúlese el porcentaje de eliminación (D_{SC}) con ayuda de la fórmula siguiente:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Expresión de los resultados del ensayo

46. Represéntese el porcentaje de eliminación D_t y D_{ST} (o D_{SC}), si está disponible, frente al tiempo (véase el apéndice 2 del capítulo C.10 A). Tómese la media (redondeada al número entero más próximo) y la desviación típica de los 12-15 valores de D_T (y de D_{ST}, si se dispone de ellos) obtenidos en la fase de meseta como porcentaje de eliminación de la sustancia problema. De la forma de la curva de eliminación pueden deducirse ciertas conclusiones sobre los procesos de eliminación.

Adsorción

47. Si al inicio del ensayo se observa una elevada eliminación del COD de la sustancia problema, es probable que esta se elimine por adsorción a la biopelícula. Quizá sea posible comprobar este extremo determinando la sustancia problema adsorbida a los sólidos arrancados de la película. No es normal que la eliminación del COD de sustancias adsorbibles se mantenga elevada durante todo el ensayo; normalmente la eliminación es intensa al principio y después va cayendo gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio. Si, no obstante, la sustancia problema adsorbida pudiera causar de alguna forma la aclimatación de la población microbiana, la eliminación del COD de la sustancia problema aumentaría posteriormente y alcanzaría un elevado nivel de meseta.

Tiempo de latencia

48. Como en los ensayos exploratorios estáticos, muchas sustancias problema requieren una fase de latencia antes de que se produzca la biodegradación plena. En esta fase de latencia, tiene lugar la aclimatación o adaptación de las bacterias competentes, sin que haya apenas eliminación de la sustancia problema; después empieza el crecimiento de estas bacterias. Esta fase termina y se acepta arbitrariamente que comienza la fase de degradación cuando se ha eliminado alrededor del 10 % de la cantidad inicial de sustancia problema (después de tener en cuenta la adsorción, en su caso). La fase de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

Fase de meseta

49. La fase de meseta de una curva de eliminación en un ensayo continuo se define como la fase en que se produce el máximo de degradación. Esta fase debe durar al menos 3 semanas y permitir la medición de unos 12-15 valores válidos.

Grado medio de eliminación de la sustancia problema

50. Calcúlese la media de los valores de eliminación D_t (y D_{st}, cuando se disponga de ellos) de la sustancia problema en la fase de meseta. Redondeado al entero más próximo (1 %), es el grado de eliminación de la sustancia problema. Se recomienda calcular asimismo el intervalo de confianza del 95 % para la media. De forma análoga, calcúlese el grado medio (D_B) de eliminación del medio orgánico en el recipiente de control.

▼M4

Indicación de la biodegradación

51. Si la sustancia problema no se adsorbe significativamente a la biopelícula y la curva de eliminación tiene la forma típica de una curva de biodegradación con fases de latencia, de degradación y de meseta (puntos 48 y 49), la eliminación medida puede atribuirse con seguridad a la biodegradación. Si ha tenido lugar una eliminación inicial importante, el ensayo de simulación no puede diferenciar entre el proceso de eliminación biológico y el abiótico. En tales casos, y en otros en que haya alguna duda sobre la biodegradación (por ejemplo, si se produce eliminación), se deben analizar en muestras de la película las sustancias problema adsorbidas o efectuar ensayos adicionales estáticos (exploratorios) de la biodegradación, en relación con parámetros que indiquen claramente si se trata de procesos biológicos. Tales ensayos son los métodos de consumo de oxígeno (capítulo C.4-D, E y F del presente anexo) (9) o un ensayo con medición de la producción de CO_2 (capítulo C.4-C del presente anexo) o el método del espacio de cabeza (10); debe utilizarse como inóculo biopelícula preexpuesta del reactor adecuado.

52. Si se han medido tanto la eliminación del COD como la eliminación específica de la sustancia, una diferencia significativa (siendo la primera más baja que la segunda) entre los porcentajes de eliminación indica la presencia en los efluentes de productos orgánicos intermedios que pueden ser más difíciles de degradar; habrá que investigar tales productos.

Validez de los resultados del ensayo

53. Se considera que el ensayo es válido si el grado de eliminación (D_B) del COD (o de la DQO) en las unidades de control es > 80 % tras dos semanas y no se han observado fenómenos inusuales.

54. Si se ha sometido a ensayo una sustancia (de referencia) fácilmente biodegradable, el grado de biodegradación debe ser > 90 % y la diferencia entre los valores de los duplicados no debe superar el 5 %. Si no se cumplen estos dos criterios, revísense los procedimientos experimentales u obténgase agua residual doméstica de otra fuente.

55. Análogamente, las diferencias entre los valores de la biodegradación de unidades duplicadas (en su caso) en que se trate una sustancia problema no deben superar el 5 %. Si no se cumple este criterio pero las eliminaciones son altas, continúese el análisis durante otras tres semanas. Si la eliminación es baja, investíguense los efectos inhibidores de la sustancia problema si no se conocen, y repítase el ensayo con una concentración menor de la sustancia problema, cuando sea posible.

Informe del ensayo

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Datos de identificación.

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas.

Condiciones de ensayo:

— Eventuales modificaciones del sistema de ensayo, especialmente si se han estudiado sustancias insolubles o volátiles.

— Tipo de medio orgánico.

— Proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se utilizan y conocen.

— Método de inoculación.

▼M4

— Solución madre de sustancia problema: contenido en COD (carbono orgánico disuelto) y COT (carbono orgánico total), forma de preparación si se trata de una suspensión, concentración o concentraciones usadas y justificación si están fuera de la banda de 10 a 20 mg/l de COD, método de adición, fecha de la primera adición, cambios eventuales en la concentración.

— Tiempo medio de retención hidráulica (sin crecimiento), velocidad de giro del tubo, ángulo aproximado de inclinación, si es posible.

— Detalles del arranque, tiempo e intensidad.

— Temperatura del ensayo y banda.

— Técnicas analíticas empleadas.

Resultados del ensayo:

— Todos los datos medidos: COD, DQO, análisis específicos, pH, temperatura, sustancias nitrogenadas (cuando sea pertinente).

— Todos los valores calculados de D_t (o D_{tc}), D_B, D_S obtenidos en formato tabular y las curvas de eliminación.

— Información sobre las fases de latencia y de meseta, duración del ensayo, grado de eliminación de la sustancia problema, de la sustancia de referencia (si se utiliza) y del medio orgánico (en la unidad de control), junto con información estadística y declaraciones sobre la biodegradabilidad y la validez del ensayo.

— Discusión de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil" A-F.

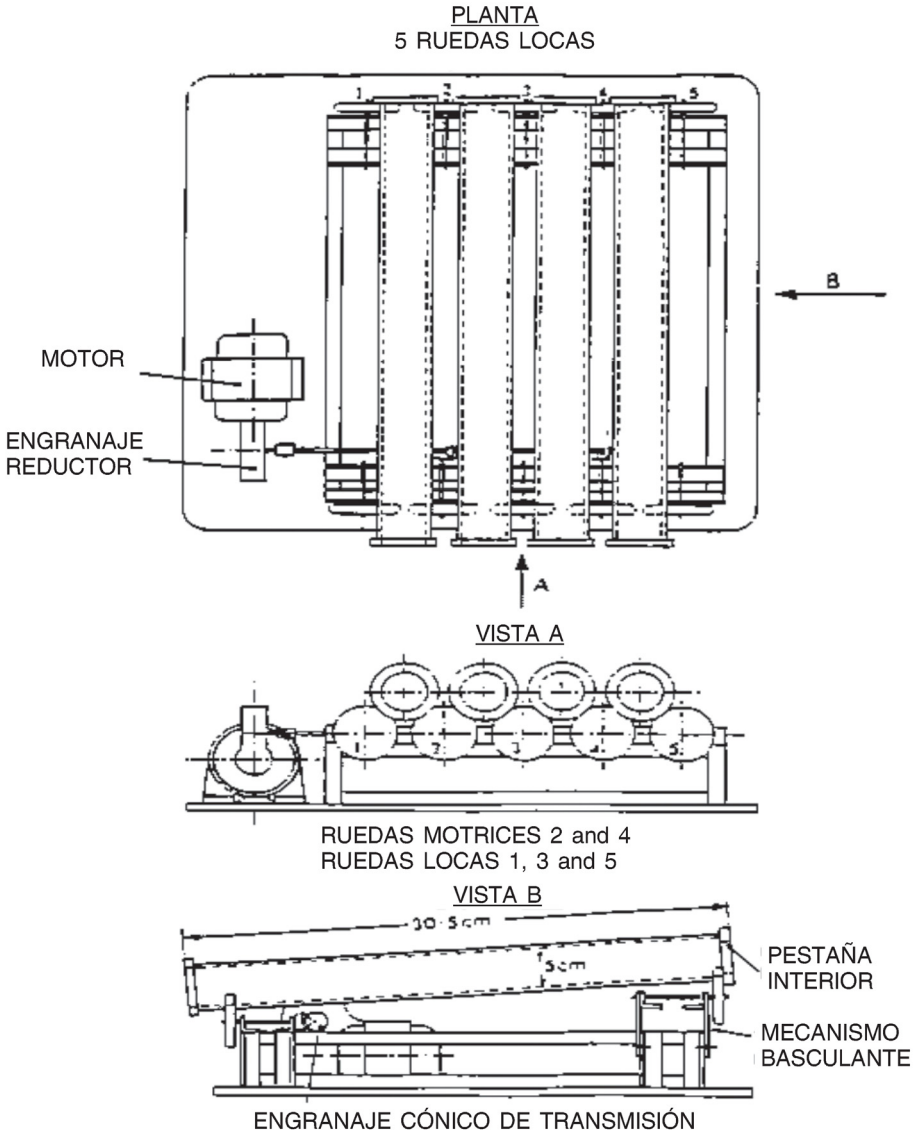
(10) ISO 14593 (1998). Calidad del agua-Evaluación de la biodegradabilidad final de las sustancias orgánicas en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico liberado en recipientes cerrados.

▼M4

Apéndice 8

Figura 1

Tubos giratorios



Glosario:

Planta

Vista A/B

Ruedas motrices

Ruedas locas

Motor

Engranaje reductor

Pestaña interior

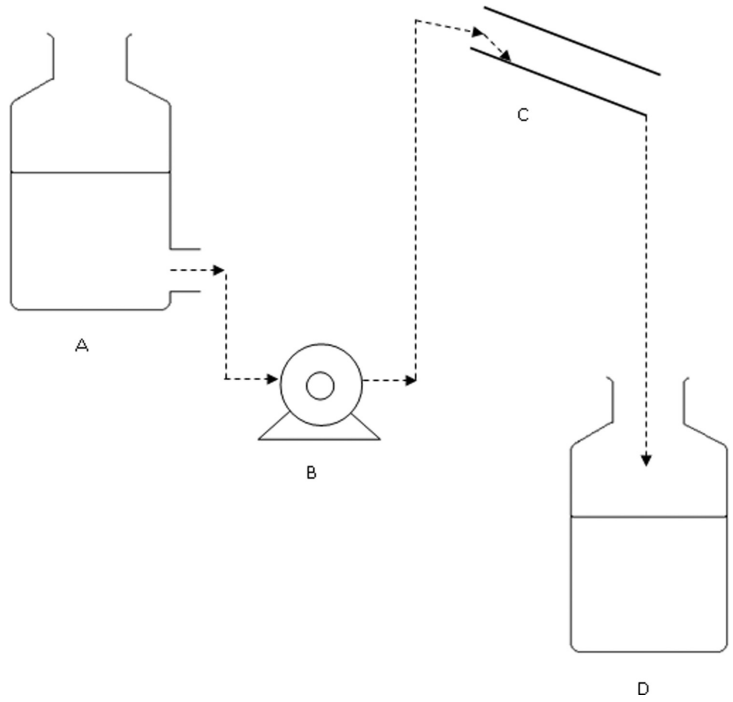
Mecanismo basculante

Engranaje cónico de transmisión

▼**M4**

Figura 2

Diagrama de flujo



A: Tanque de alimentación

B: Bomba peristáltica

C: Tubo giratorio

D: Recipiente de recogida del efluente

DEFINICIONES:

a. Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

b. Sustancias: Ha de señalarse que en los acuerdos de la CNUMAD y en los documentos subsiguientes se usa el término "producto químico" para referirse a sustancias, productos, mezclas, preparados, o cualesquiera otras denominaciones utilizadas en los sistemas actuales para describir los productos químicos en cuestión. En el presente documento se utiliza el término "sustancia" en este mismo sentido amplio.

▼B

C.11. **BIODEGRADACIÓN**

LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN

MÉTODO

1.1. INTRODUCCIÓN

El método descrito en este anexo sirve para evaluar el efecto que la sustancia objeto de ensayo tiene sobre los microorganismos, midiendo la tasa de respiración en unas condiciones determinadas y en presencia de concentraciones diferentes de la misma.

El propósito de este método consiste en establecer un método de investigación rápido por el que se puedan identificar las sustancias que afectan de manera adversa a las plantas de tratamiento microbiano aeróbico, así como indicar las concentraciones no inhibitorias apropiadas de las sustancias objeto de ensayo que vayan a ser utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad.

Una prueba preliminar puede realizarse antes de la prueba definitiva. Esta nos facilitará información acerca del rango de concentraciones que deben utilizarse en la prueba final.

Al proyectar la prueba se incluyen dos muestras control sin la sustancia objeto de ensayo, una al principio y otra al final de la serie de pruebas. Cada lote de lodo activado debe ser revisado utilizando una sustancia de referencia,

Este método es más fácilmente aplicable a sustancias que, debido a su solubilidad en agua y a su baja volatilidad, es probable que permanezcan en el agua.

Para sustancias con solubilidad limitada en el medio de prueba, puede que no sea posible la determinación del valor CE_{50}.

Cuando la sustancia de prueba es propensa a provocar la fosforilación oxídativa, los resultados basados en la disminución de oxígeno pueden conducir a conclusiones erróneas.

Para realizar el ensayo conviene disponer de la siguiente información:

— solubilidad en agua,

— presión de vapor,

— fórmula estructural,

— pureza de la sustancia objeto del ensayo.

Recomendación.

El lodo activado puede contener organismos potencialmente patógenos; manéjese con cuidado.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La tasa de respiración es el consumo de oxígeno que tiene lugar en el lodo activado en condiciones aerobias por los microorganismos procedentes de aguas residuales; se expresa generalmente en mg O_2 por mg de lodo en una hora.

▼B

Para poder calcular el efecto inhibitorio de una sustancia de prueba a una determinada concentración, la tasa de respiración se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de las dos muestras control:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{parcentajeinhibiciún}$$

donde:

R_s = consumo de oxígeno de la sustancia de prueba a la concentración utilizada en el ensayo

RC_1 = consumo de oxígeno de la muestra control 1

RC_2 = consumo de oxígeno de la muestra control 2.

En este método el valor CE_{50} expresa la concentración de la sustancia de prueba en la que la tasa de respiración es el 50 % de la obtenida en la muestra control, en las condiciones descritas en el método de ensayo.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como sustancia de referencia, se recomienda utilizar 3,5-didorofenol, conocido inhibidor de la respiración, efectuando una prueba para determinar el valor de CE_{50} en cada lote de lodo activado, a fin de comprobar que la sensibilidad del lodo no es anormal.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La tasa de respiración de un lodo activado alimentado con una cantidad estándar de agua residual sintética, se determina después de un tiempo de contacto de 30 minutos, o de 3 horas, o de ambos. La tasa de respiración del mismo lodo activado se mide también en presencia de varias concentraciones de la sustancia de prueba y en condiciones idénticas. El efecto inhibitorio de la sustancia de prueba, a una determinada concentración, se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de dos muestras control. El valor de CE_{50} se calcula mediante determinaciones realizadas a diferentes concentraciones.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Los resultados de la prueba son válidos si:

— las tasas de respiración de las muestras de control difieren una de la otra en menos de 15 %,

— el valor de CE_{50} (30 minutos y/o tres horas) del 3,5-diclorofenol está dentro de los límites aceptados de 5 a 30 mg/l.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. *Reactivos*

1.6.1.1. Soluciones de la sustancia de prueba

Las soluciones de la sustancia objeto del ensaya se preparan en el momento de comenzar el estudio, usando una solución madre. Para esta solución, es apropiada una concentración de 0,5 gr/l, si se sigue el procedimiento recomendado más abajo.

▼B

1.6.1.2. Solución de la sustancia de control

Puede prepararse por ejemplo una Solución de 3,5-diclorofenol disolviendo 0,5 g de 3,5-diclorofenol en 10 ml de NaOH, 1 M, diluyendo esta mezcla con agua destilada hasta un volumen de 30 ml aproximadamente, añadiendo a continuación y a la ver que se agita H_2SO_4 0,5 M hasta el punto de precipitación incipiente, para lo que se requieren 8 ml aproximadamente de H_2SO_4 0,5 M, y finalmente diluyendo la mezcla con agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de esta solución deberá estar entre 7 y 8.

1.6.1.3. Aguas residuales sintéticas

El agua residual sintética para alimentación de los lodos se obtiene disolviendo las siguientes cantidades de sustancias en un litro de agua:

— 16 g de peptona,

— 11 g de extracto de carne,

— 3 g de urea,

— 0,7 g de NaCl,

— 0,4 g de $CaCl_2$ $2H_2O$,

— 0,2 g de $MgSo_4.7H_2O$,

— 2,8 g de K_2HPO_4.

Nota 1: Estas aguas residuales sintéticas están 100 veces más concentradas que las descritas en el Informe Técnico de la OCDE, «Método propuesto para la determinación de la biodegradabilidad de los tensoactivos utilizados en los detergentes sintéticos» del 11 de junio de 1976; además se les añade fosfato bipotásico.

Nota 2: Si el medio así preparado no va a utilizarse inmediatamente, deberá conservarse en la oscuridad y a una temperatura de 0 a 4 ºC, durante un período que no exceda de una semana y en condiciones que no provoquen cambio alguno en su composición. También puede esterilizarse antes de su conservación, o bien añadir los extractos de peptona y carne poco antes de efectuar la prueba. Antes de utilizar la solución, deberá mezclarse a fondo y regular su pH.

1.6.2. *Aparato de medida*

El dibujo exacto no es crítico. Sin embargo, no debe quedar espacio en la cabeza y la muestra debe encajar herméticamente en el cuello del frasco de medida.

Se necesita un equipamiento normal de laboratorio y, especialmente, lo siguiente:

— aparato de medida,

— dispositivo de aireación,

— electrodo de pH y equipo de medida,

— electrodo de O_2.

1.6.3. *Preparación del inóculo*

El inóculo microbiano para esta prueba proviene del lodo activado procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales predominantemente domésticas.

Si es necesario, al volver al laboratorio, pueden eliminarse las partículas gruesas o grumos dejando sedimentar un poco, por ejemplo durante 15 minutos, y decantando la capa superior de sólidos más finos para su uso. También puede mezclarse el lodo con un mezclador durante algunos segundos.

▼B

Si se piensa que puede hallarse presente material inhibidor, deberá lavarse el lodo con agua corriente o con una solución isotómica. Después de centrifugar se decanta el sobrenadante (este procedimiento se repite tres veces).

Seguidamente, se pesa y se seca una pequeña cantidad de lodo lavado. A partir de estos resultados, se puede calcular la cantidad de lodo húmedo que debe ser suspendida en agua para obtener un lodo activado con un rango de concentración de sólidos en suspensión de 2 a 4 gr/l. Este nivel supone una concentración entre 0,8 y 1,6 gr/l en el medio de prueba, si se sigue el procedimiento recomendado más adelante.

Si no pudiera utilizarse el lodo el mismo día en que se ha recogido, se añadirán 50 ml de aguas residuales sintéticas a cada litro de lodo activado que haya sido preparado como se describe anteriormente; esta mezcla se airea durante la noche a una temperatura de 20 ± 2 ºC, y se mantiene en estas condiciones durante el día, preparado para su utilización, Antes de utilizarlo, se comprueba el pH y, si es necesario, este se ajusta hasta un valor de entre 6,0 y 8,0. El nivel de sólidos en suspensión se determina como se describe en el párrafo anterior.

Si en días posteriores (cuatro como máximo), es necesario utilizar el mismo lote de lodo, se le añaden 50 ml de aguas residuales sintéticas por litro de lodo al final de cada día de trabajo.

1.6.4. *Realización de la prueba*

Duración/tiempo de contacto:	30 minutos y/o 3 horas, tiempo durante el cual tiene lugar la aireación.
Agua:	Agua potable (si es necesario, declorada).
Suministro de aire:	Aire limpio, sin aceite. Caudal de aire de 0,5 a 1 litro/minuto.
Aparato de medida:	Matraz de fondo plano, como por ejemplo, un frasco DBO (véase la figura 1).
Medidor de oxígeno:	Electrodo de oxígeno adecuado, con un registrador.
Solución nutritiva:	Aguas residuales sintéticas (véase más arriba).
Sustancia de prueba:	La solución de prueba se prepara en el momento de comenzar la prueba.
Sustancia de referencia:	Por ejemplo, 3,5-diclorofenol (tres concentraciones como mínimo).
Muestra de control:	Muestra inoculada sin sustancia de prueba.
Temperatura:	20 ± 2 ºC.

A continuación se sugiere un procedimiento experimental, que puede seguirse para ambas sustancias, la de prueba y la de referencia, y para un período de contacto de 3 horas:

Se utilizan varios recipientes (por ejemplo, vasos de precipitado de 1 litro),

Se usarán como mínimo cinco concentraciones, distanciadas por un factor constante que, preferiblemente, no exceda de 3,2.

A tiempo «O», se mezclan 16 ml de cultivo de aguas residuales sintéticas con agua, hasta obtener 300 mi, a los que se añaden 200 ml de inóculo microbiano, y la mezcla total (500 ml) se vierte en el primer recipiente (primera muestra de control, C_t). Los recipientes de la prueba deberán airearse continuamente para asegurar que el O_2 disuelto no se hace menor de 2,5 mg/l y que, justo antes de la medida de la tasa de respiración, la concentración de O_2 deberá ser de unos 6,5 mg/l.

▼B

A los 15 minutos (15 minutos es un intervalo arbitrario, aunque conveniente), se repite el procedimiento anterior, con la diferencia de que, antes de añadir agua hasta llegar a 300 ml e inóculo microbiano hasta obtener un volumen de 500 ml, se añaden 100 ml de la solución madre de sustancia de prueba a los 16 ml de aguas residuales sintéticas. Seguidamente, esta mezcla se vierte en un segundo recipiente y se airea como se ha expuesto anteriormente. Este proceso se repite a intervalos de 15 minutos con diferentes volúmenes de solución madre de sustancia de prueba, para obtener una serie de recipientes que contengan concentraciones diferentes de la sustancia de prueba, Finalmente, se prepara una segunda muestra de control (C_2).

Después de tres horas se mide el pH y se vierte bien mezclado el contenido del primer recipiente en el aparato de medida, en el que se mide la tasa de respiración durante un período de hasta 10 minutos.

Esta determinación se repite a intervalos de 15 minutos con el contenido de cada recipiente, de tal manera que el tiempo de contacto de cada recipiente sea de 3 horas.

La sustancia de referencia se prueba en cada lote de inóculo microbiano siguiendo el mismo procedimiento.

Cuando vayan a tomarse las medidas después de 30 minutos de contacto, se necesitará un régimen diferente (por ejemplo, más de un medidor de oxígeno).

Cuando sea necesario medir el consumo químico de oxígeno, se preparan más recipientes que contengan la sustancia de prueba, el medio nutriente de aguas residuales sintéticas y agua, pero no lodo activado.

El consumo de oxígeno se mide y se registra después de un tiempo de aireación de 30 minutos y/o de tres horas (tiempo de contacto).

2. **DATOS Y EVALUACIÓN**

La tasa de respiración se calcula a partir del trazado del registrador en mg O_2/l.h, con valores aproximados de entre: 6,5 mg O_2/l y 2,5 mg O_2/l, o cuando la tasa de respiración sea baja, durante un período de 10 minutos. La parte de la curva de respiración sobre la que se mide la tasa de respiración debe ser lineal.

Cuando las tasas de respiración de las dos muestras de control difieran en más del 15 por ciento o el valor de CE_{50} (30 minutos y/o 3 horas) de la sustancia de referencia no quede dentro de la gama aceptada (de 5 a 30 mg/l para el 3,5-diclorofenol), la prueba no será válida y deberá repetirse.

El porcentaje de inhibición se calcula para cada concentración de prueba como se ha descrito anteriormente, y se representa gráficamente en función de la concentración en un papel logarítmico normal (o logaritmo-probabilidad); para obtener el valor de CE_{50}.

Los límites de confianza del 95 % de los valores de CE_{50} se pueden determinar usando procedimientos establecidos.

▼B

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DE LA PRUEBA

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— sustancia de prueba: datos de identificación química,

— sistema de prueba: fuente, concentración y cualquier tratamiento previo del lodo activado,

— condiciones de la prueba:

  — pH de la mezcla de reacción antes de la medición de la respiración,

  — temperatura de prueba,

  — duración de la prueba,

  — sustancia de referencia y su valor medido de CE_{50},

  — absorción abiótica de oxígeno (si la hubiere),

— resultados:

  — todos los datos medidos,

  — curva de inhibición y método para calcular el valor de CE_{50},

  — valor de CE_{50} y, si es posible, límites de confianza del 95 %, CE_{10} y CE_{10},

  — todas las observaciones y cualquier desviación de este método de prueba que pueda haber influido sobre el resultado.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

El valor de CE_{50} se considerará solamente como indicación de los probables efectos tóxicos de la sustancia de prueba sobre los microorganismos de aguas residuales o de depuración de lodo activado, si se tiene en cuenta que las complejas interacciones que ocurren en el medio ambiente no pueden ser simuladas con precisión de una prueba de laboratorio. Además, las Sustancias de prueba que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la oxidación amónica pueden producir también curvas de inhibición atípicas. En razón de esto, dichas curvas deberán interpretarse con cautela.

REFERENCIAS

(1) International Standard ISO 8192-1986.

(2) Broccker, B., and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).

(3) Brown, D., Hitz, H. R., and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method* No. 103, also describid *by:*

(5) Robra, B., *Vasser/Abwasser* 117, 80 (1976).

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 247 (1977).

(7) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 209,* Decisión del Consejo C(81) 30 final.

▼B

C.12. **BIODEGRADACIÓN**

PRUEBA LASC MODIFICADA

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del método es la evaluación del potencial de biodegradabilídad última o total de sustancias orgánicas hidrosolubles y novolátiles, cuando se exponen a concentraciones relativamente altas de microorganismos durante un largo período de tiempo. Se mantiene durante este período la viabilidad de los microorganismos añadiendo diariamente una alimentación de aguas residuales decantadas. Para las necesidades del fin de semana, pueden almacenarse las aguas residuales a 4 ºC. Pueden emplearse como alternativa las aguas residuales sintéticas de la prueba de confirmación OCDE.

Puede producirse una absorción fisicoquímica sobre los sólidos en suspensión, y este hecho deberá tomarse en cuenta al interpretar los resultados (véase el punto 3.2).

Debido al largo período de retención de la fase líquida (36 horas) y a la adición intermitente de nutrientes, la prueba no simula las condiciones reinantes en una planta depuradora de aguas residuales. Los resultados obtenidos con diversas sustancias de prueba indican que la prueba tiene un elevado potencial de biodegradación.

Las condiciones que la prueba establece son muy favorables a la selección y/o adaptación de microorganismos capaces de degradar el compuesto de prueba (el procedimiento puede utilizarse también para obtener inóculos aclimatados destinados a emplearse en otras pruebas).

En este método se emplea la medida de la concentración del carbono orgánico disuelto para evaluar la biodegradabilidad total de las sustancias de prueba. Resulta preferible determinar el COD por acidificación y purgado más que por la diferencia de C_{total}-$C_{iriorginico.}$.

El empleo simultáneo de un método analítico específico puede permitir también evaluar la degradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El método solo es aplicable a las sustancias orgánicas de prueba que, a la concentración empleada en la prueba,

— sean solubles en agua, (como mínima, 20 mg de carbono orgánico dísuelto/l),

— posean una presión de vapor despreciable,

— no posean efecto inhibidor sobre las bacterias,

— no se absorban significativamente dentro del sistema de prueba,

— no escapen de la solución de prueba por formación de espumas.

Deberá determinarse el contenido de carbono orgánico del material de prueba.

▼B

Para interpretar los resultados obtenidos, será útil la información sobre las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de prueba, particularmente en los casos para los que los resultados sean bajos o marginales.

Para la interpretación de resultados bajos y para la selección de una concentración de prueba idónea podrá ser útil la información sobre la toxicidad de la sustancia de prueba para los microorganismos.

1.2. DEFINICIONES DE U NIDADES

C_T = concentración del compuesto de prueba como carbono orgánico presente o añadido a las aguas residuales sedimentadas al comienzo del período de aireación (mg/l).

C_2 = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante de la prueba al término del período de aireación (mg/l).

C_c = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante del control al término del período de aireación (mg/l).

En este método, la biodegradación se define como la desaparición del carbono orgánico. La biodegradación puede expresarse como:

1. La eliminación porcentual D_{2d} de la cantidad de sustancia añadida diariamente;

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

D_{ad} = degradación/adición diaria.

2. La eliminación porcentual D_{id} de la cantidad de sustancia presente al inicio de cada día:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

D_{sid} = degradación/substancia al inicio del día.

Donde los índices i e (i + 1) se refieren al día de la medición.

Se recomienda la ecuación [2 a)] si el COD efluente varía de día a día, mientras que la ecuación [2 b)] puede emplearse cuando el COD efluente permanezca relativamente constante de un día para otro.

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

En algunos casos, al investigar una sustancia nueva, serán útiles las sustancias de referencia; sin embargo, no se recomienda en el método ninguna sustancia de referencia específica.

Se proporcionan los datos de diversos compuestos evaluados en pruebas efectuadas en varios laboratorios (véase el anexo 1). En principio esto puede ser llevado a cabo periódicamente como calibración del método y para comparar los resultados obtenidos cuando se emplea un método distinto.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE LA PRUEBA

Se coloca en una unidad de lodo activado semicontinuo (LASC) lodo activado procedente de una planta depuradora de aguas residuales. Se añaden el compuesto de prueba y aguas residuales domésticas decantadas, aireándose la mezcla durante 23 horas. Se interrumpe entonces la aireación, permitiéndose que el lodo se deposite por sedimentación y retirándose el líquido sobrenadante.

Se mezcla a continuación el lodo que permanece en la cámara de aireación con una cantidad igual del compuesto de prueba y de aguas residuales, repitiéndose el ciclo.

La biodegradación se determina por el contenido en carbono orgánico disuelto del líquido sobrenadante. Se compara dicho valor con el obtenido en un tubo de control en el que se han introducido solo aguas residuales decantadas.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No ha sido bien establecida aún la reproducibilidad de este método basado en la eliminación del carbono orgánico disuelto (cuando se considera la biodegradación primaria, se obtienen datos muy precisos para las sustancias degradadas en gran medida),

La sensibilidad del método viene determinada en gran parte por la variabilidad del control y, en menor grado, por la precisión de la determinación del carbono orgánico disuelto y por el contenido del compuesto de prueba en el líquido al comienzo de cada ciclo.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1.6.1. *Preparativos*

Se reúne un número suficiente de unidades limpias de aireación (también puede usarse alternativamente la unidad original de prueba LASC de 1,5 l) y de tubos de entrada de aire (figura 1) para cada sustancia de prueba *y* para los controles. El aire comprimido suministrada a las unidades de prueba, que se purifica pasándolo por un filtro de lana de algodón, debe hallarse exento de carbono orgánico y presaturado con agua, a fin de reducir las pérdidas por evaporación.

Se toma una muestra de líquido mixto, que contenga de 1 a 4 g de sólidos en suspensión por litro de una central depuradora de lodo activado en la que se depuren sobre todo aguas residuales domésticas. Para cada unidad de aireación se requieren aproximadamente 150 ml de líquido mixto.

▼B

Se preparan en agua destilada soluciones madre de la sustancia de prueba; la concentración exigida normalmente es de 400 mg/l como carbono orgánico, lo que supone una concentración del compuesto de prueba de 20 mg/l de carbono al inicio de cada ciclo de aireación, si no tiene lugar una biodegradación.

Pueden emplearse concentraciones más altas si la toxicidad frente a los microorganismos lo permite.

Se mide el contenido en carbono orgánico de las soluciones madre.

1.6.2. *Condiciones de la prueba*

La prueba deberá llevarse a cabo a 20 a 25 ºC.

Se utiliza una concentración elevada de microorganismos aerobios (de 1 a 4 g/l de sólidos en suspensión), y el período efectivo de retención es de 36 horas. La materia carbonada existente en las aguas residuales que sirven de alimentación resulta oxidada en gran medida, normalmente al cabo de 8 horas tras el inicio de cada ciclo de aireación. A continuación, el lodo respira endógenamente durante el resto del período de aireación, siendo entonces el compuesto de prueba el único sustrato disponible, a menos que este resulte también rápidamente metabolizado. Estos factores, junto con el de la reinoculación diaria de la solución de prueba cuando se utilizan como medio aguas residuales domesticas, ofrecen condiciones muy favorables para que se produzcan la aclimatación y un alto grado de biodegradación.

1.6.3. *Ejecución de la prueba*

Se toma una muestra de líquido mixto de una estación de depuración de lodo activado predominantemente de origen doméstico, ó bien de un laboratorio, y se mantiene en condiciones aerobias hasta emplearla en el laboratorio. Se llena cada unidad de aireación, y la unidad de control, con 150 ml (si se utiliza la unidad original de' prueba LASC, deben multiplicarse los volúmenes dados por 10) de líquido mixto, y se da inicio a la aireación. Transcurridas 23 horas, se interrumpe la aireación y se permite que el lodo sedimente durante 45 minutos. Se abre sucesivamente la espita de cada recipiente, y se retiran de cada uno 100 ml del líquido sobrenadante. Se toma, inmediatamente antes de su uso, una muestra de aguas residuales domésticas decantadas y se añaden 100 ml al lodo que permanece en cada unidad de aireación. Se vuelve a comenzar la aireación. En esta fase no se añaden sustancias de prueba, y las unidades se alimentan diariamente con aguas residuales domésticas solo hasta que se obtenga un líquido sobrenadante transparente después de la decantación. El tiempo necesario para ello es por lo general de 2 semanas, transcurridas las cuales el carbono orgánico disuelto contenido en el líquido sobrenadante al término de cada ciclo de aireación se acerca a un valor constante,

Al término de este período, se mezclan Jos diferentes lodos decantados, y se añaden a cada unidad 50 mL del lodo compuesto resultante.

Se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de agua a las unidades control; por su parte, a las unidades de ensayo se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de la solución madre (400 mg/l) del compuesto en estudio. Se recomienza la aireación y se mantiene durante 23 horas. Se deja entonces que el lodo decante durante 45 minutos, recogiéndose a continuación el líquido sobrenadante y analizándose el mismo, a fin de establecer su contenido en carbono orgánico disuelto.

Se repite diariamente durante toda la duración de la prueba el procedimiento mencionado de llenado y recogida.

▼B

Antes de la sedimentación, puede resultar necesario limpiar las paredes de las unidades para impedir que se acumulen sólidos por encima del nivel de líquido. Se utiliza para cada unidad un raspador o un cepillo individual, a fin de impedir que se produzca una contaminación cruzada.

Idealmente, eí carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes se determinará diariamente, aunque puede permitirse una frecuencia menor de análisis. Antes de efectuar el análisis, se filtran los líquidos a través de filtros de membrana de 0,45 μm lavados o se centrifugan los mismos. Los filtros de membrana son adecuados si es seguro que ni liberan carbono ni absorben sustancia en la fase de filtración. La temperatura de la muestra no debe superar los 40 ºC mientras se halle dentro de la centrífuga.

La duración de la prueba para compuestos con poca o ninguna degradación es indeterminada, pero la experiencia sugiere que generalmente debería alcanzar al menos 12 semanas, sin superar las 26.

2. **DATOS Y EVALUACIÓN**

Se representan en un diagrama frente al tiempo, los valores del carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes de las unidades de prueba y de las unidades de control.

Según se va produciendo la biodegradación, el nivel encontrado en la muestra se aproximará al nivel del control. Una vez que la diferencia entre los dos niveles resulta constante para tres medidas consecutivas, se efectúa el número de medidas adicionales que sea suficiente para permitir el tratamiento estadístico de los datos, y se calcula con ellos la biodegradación porcentual del compuesto de prueba (D_{ad} o D_{sid}, véase el punto 1.2).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DE LA PRUEBA

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— toda la información sobre el tipo de aguas residuales, el tipo de unidad empleado y los resultados experimentales relativos a la sustancia probada, la sustancia de referencia (si se usa), y el control,

— la temperatura,

— la curva de eliminación, con descripción y método de cálculo (véase 1,2),

— la fecha y el emplazamiento donde se tomó la muestra del lodo activado y de las aguas residuales, el estado de adaptación, concentración, etc.,

— razones científicas para efectuar cualquier modificación del procedimiento de la prueba,

— firma y fecha.

▼B

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que la sustancia que deberá probarse con este método no será fácilmente biodegradable, toda eliminación del COD debida exclusivamente a la biodegradación será normalmente gradual, extendiéndose durante días o semanas, excepto en los casos en los que la aclimatación sea brusca, como indica una desaparición abrupta que tenga lugar tras algunas semanas.

Sin embargo, la absorción fisicoquímica puede jugar en ocasiones un papel importante; esto se apreciará cuando se produzca desde el principio una eliminación completa o parcial del COD añadido. Lo que sucede a continuación depende de factores tales como los grados de absorción y la concentración de sólidos en suspensión en la descarga del efluente. Generalmente, la diferencia entre las concentraciones del COD en los líquidos de control y en los líquidos sobrenadantes de la prueba se incrementa gradualmente a partir de un valor inicial bajo, permaneciendo a continuación con el nuevo valor durante el resto del experimento a menos que tenga lugar la aclimatación.

Si debe llevarse a cabo una distinción entre la biodegradación (o la biodegradación parcial) y la absorción, son necesarias otras pruebas. Estas pueden efectuarse de diversas maneras, pero la más convincente consiste en utilizar el líquido sobrenadante, o el lodo, como inóculo para una prueba de grupo base (preferiblemente una prueba respirométrica).

Las sustancias de prueba que produzcan una eliminación alta y no adsortiva del COD en esta prueba deberán considerarse como potencialmente biodegradables. La eliminación parcial y no adsortiva indica que el producto químico experimenta al menos algo de biodegradación.

Las eliminaciones bajas o nulas del COD pueden ser debidas a que la sustancia de prueba tiene efecto inhibidor sobre los microorganismos, y esto puede quedar de manifiesto también por lisis y pérdida de lodo, produciéndose sobrenadantes turbios. En este caso, deberá repetirse la prueba empleando una concentración menor de la sustancia de prueba.

El empleo de un método analítico específico, o de una sustancia de prueba marcada con ^{14}C puede proporcionar una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de prueba marcado con ^{14}C, la recuperación de $^{14}CO_2$ confirmará que ha tenido lugar la biodegradación.

Cuando los resultados se expresen también en términos de biodegradación primaria, deberá explicarse también, si ello es posible, el cambio en la estructura química que produce la pérdida de respuesta de la sustancia inicial de prueba.

Deberá indicarse la validación del método analítico junto con la respuesta encontrada con el medio del control.

4. **REFERENCIAS**

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 A,* Decisión del Consejo C(81) 30 final.

▼B

Apéndice 1

Prueba LASC: Ejemplo de resultados

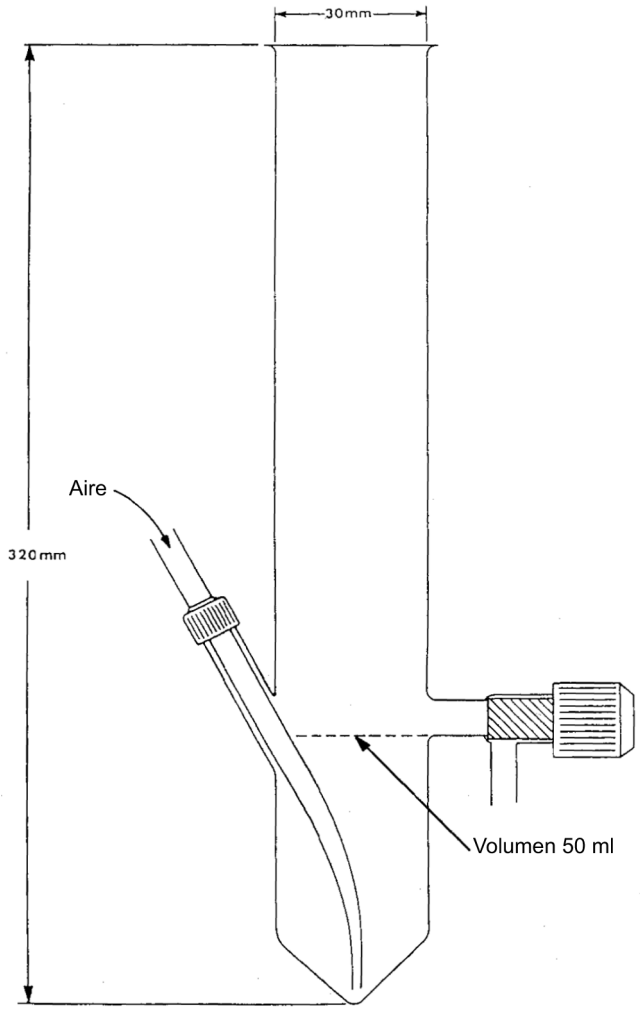
Sustancia	C_T (mg/l)	C_T-C_e (mg/l)	Porcentaje de biodegradación (D_{od})	Duración del ensayo (días)
4-acetil aminobenceno sulfonato	17,2	2,0	85,0	40
Tetra propilen benceno sultanato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenil	16,9	0,8	95,3	40
Dieril glicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetra ciclopentano carboxilato	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Apéndice 2

Ejemplo del aparato de ensayo

Figure 1



▼B

C.13 **BIOCONCENTRACIÓN: ENSAYO DINÁMICO CON PECES**

1. **MÉTODO**

El presente método de bioconcentración reproduce las directrices de la OCDE TG 305 (1996).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método describe un procedimiento para caracterizar el potencial de bioconcentración de algunas sustancias en peces en condiciones dinámicas. Son preferibles los regímenes de ensayos dinámicos, pero los regímenes semiestáticos son también aceptables en la medida en que se satisfagan los criterios de validez.

El método da toda la información necesaria para la ejecución del ensayo pero deja libertad suficiente para la adaptación del diseño experimental a las condiciones específicas de cada laboratorio y para variar las características de las sustancias de ensayo. Conviene especialmente a los productos orgánicos estables cuyos valores de log P_{ow} están entre 1,5 y 6,0 (1) pero también es aplicable a las sustancias superlipofílicas (log P_{ow} > 6,0). Para estas últimas, el valor estimado del factor de bioconcentración (FBC), a veces denominado K_B, será probablemente superior al valor del factor de bioconcentración en estado de equilibrio (FBC_{SS}) que se puede esperar en un experimento de laboratorio. Pueden calcularse valores estimados del factor de bioconcentración de los productos orgánicos cuyos valores de log P_{ow} llegan hasta alrededor de 9,0 con ayuda de la ecuación de Binteín et al. (2). El potencial de bioconcentración se caracteriza por algunos parámetros, como la constante de la velocidad de absorción (k_1), la constante de la velocidad de depuración (k_2) y el FBC_{SS}.

Puede facilitarse el análisis de las muestras de agua y de peces con ayuda de sustancias de ensayo radiomarcadas, que pueden también servir para definir si se deben identificar y cuantificar las sustancias degradadas. Si se miden los residuos radiactivos totales (por ejemplo, por combustión o disolución de los tejidos), el FBC se basará en el compuesto de origen, todos los metabolitos retenidos y el carbono asimilado. El FBC basado en los residuos radiactivos totales puede, entonces, no ser directamente comparable a un FBC derivado de un análisis químico específico exclusivamente del compuesto de origen.

Se podrán aplicar procedimientos de limpieza en los estudios radiomarcados para determinar el FBC sobre la base del compuesto de origen; los principales metabolitos se determinarán sí se considera necesario. Es posible también combinar un estudio del metabolismo de los peces con un estudio de bioconcentración por análisis e identificación de los residuos en los tejidos orgánicos y órganos.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Bioconcentración/bioacumulación: es el aumento de la concentración de la sustancia de ensayo en el interior o en la superficie de un organismo (en tejidos específicos de este) en relación con la concentración de esta sustancia en el medio ambiente.

Factor de bioconcentración (FBC o K_B): en cualquier momento durante la fase de absorción de este ensayo de acumulación es la concentración de la sustancia de ensayo en el pez, o en tejidos determinados de este, [C_p expresada en µg/g (ppm)] dividida por la concentración de la sustancia en el medio ambiente [C_w, expresada en µg/ml (ppm)].

▼B

Factor de bioconcentración en estado de equilibrio (FBC_{SS} o K_B): no cambia notablemente durante un plazo de tiempo prolongado, al ser constante la concentración de la sustancia de ensayo en el medio ambiente durante este mismo período.

Meseta o estado de equilibrio: en la representación gráfica de la concentración de sustancia de ensayo en el pez (C_f) en función del tiempo, se alcanza cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos de C realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del ± 20 % entre sí, y no hay diferencias significativas entre los tres períodos de muestreo. Cuando se analizan muestras puestas conjuntamente, es necesario proceder al menos a cuatro análisis sucesivos. Si las sustancias de ensayo son absorbidas con lentitud, se optará preferiblemente por intervalos semanales.

Factores de bioconcentración: calculados directamente a partir de las constantes cinéticas (k_1/k_2) se llaman factores de concentración cinéticos, FBC_k.

Coeficiente de reparto octanol-agua (P_{ow}): es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio (método A.8); también se denomina K_{ow}. El logaritmo de P_{ow} indica el potencial de bioconcentración de una sustancia por los organismos acuáticos.

Fase de exposición o de absorción: es el tiempo durante el cual se exponen los peces a la sustancia de ensayo.

Constante de velocidad de absorción (k,): es el valor numérico que define la velocidad de aumento de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces del ensayo (o en tejidos específicos de estos) cuando se expone a esta sustancia (k_1 se expresa en días^{-1}).

Fase de post-exposición o de depuración (pérdida): es el tiempo, tras la transferencia de los peces de un medio que contiene la sustancia de ensayo a un medio libre de esta, durante el cual se estudia la depuración (o pérdida neta) de la sustancia a partir de los peces del ensayo (o de los tejidos específicos).

Constante de velocidad de depuración (pérdida) (k_2): es el valor numérico que define la velocidad de disminución de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces del ensayo (o en tejidos específicos) tras su transferencia de un medio que contiene la sustancia de ensayo a un medio que está libre de ella (k_2 se expresa en días^{-1}).

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo se divide en dos fases: la de exposición (absorción) y la de post-exposición (depuración). Durante la fase de absorción, se exponen grupos distintos de peces de una sola especie a al menos dos concentraciones de la sustancia de ensayo. Luego se transfieren a un medio libre de esta sustancia, para la fase de depuración. Esta última es siempre necesaria, excepto cuando la absorción de la sustancia durante la fase de absorción es poco importante (por ejemplo, si el FBC es inferior a 10). La concentración de la sustancia de ensayo en los peces (o tejidos específicos) se mide durante las dos fases del ensayo. Además de las dos concentraciones de ensayo, se mantiene un grupo testigo de peces en condiciones idénticas, salvo que no se exponen a la sustancia de ensayo. Esto sirve para relacionar los posibles efectos nocivos observados en el ensayo de bioconcentración con un grupo testigo correspondiente, y deducir las concentraciones de fondo de la sustancia de ensayo.

▼B

La fase de absorción dura 28 días salvo si se demuestra que el equilibrio se alcanza antes. Puede preverse la duración de la fase de absorción y el tiempo necesario para la obtención del estado de equilibrio gracias a la ecuación del anexo 3. El período de depuración comienza entonces con la transferencia de los peces a otro recipiente limpio que contiene el mismo medio, pero esta vez sin la sustancia de ensayo. Cuando sea posible, se calculará el factor de bioconcentración preferiblemente como relación entre (FBC_{SS}) de la concentración en los peces (C_f) y en el agua (C_w) en el estado de equilibrio aparente y también como factor de bioconcentración cinético, FBC_K, que es la relación entre las constantes de velocidad de absorción (k_1) y de depuración (k_2), suponiendo una cinética de primer orden. Si es evidente que no se sigue una cinética de primer orden, deberán aplicarse modelos más complejos (véase el anexo 5).

Si no se llega a un estado de equilibrio en el plazo de 28 días, la fase de absorción se prolongará hasta alcanzar este estado de equilibrio, o durante 60 días si esto supone un plazo menor; luego comenzará la fase de depuración.

La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de depuración (pérdida) (o las constantes, cuando entren en juego modelos más complejos), el factor de bioconcentración y, si es posible, los intervalos de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir del modelo que describa mejor las concentraciones medidas de la sustancia de ensayo en los peces y en el agua.

El FBC se expresa en función del peso total húmedo de los peces. Sin embargo, para algunos estudios pueden utilizarse tejidos u órganos específicos (por ejemplo, músculos, hígado) si los peces son suficientemente grandes o si es posible separar las partes comestibles (filetes) y no comestibles (vísceras). Como hay una clara relación entre el potencial de bioconcentración y la lipofilia de numerosas sustancias orgánicas, también hay una relación correspondiente entre el contenido en lípidos de los peces del ensayo y las bioconcentraciones observadas de estas sustancias. Así pues, para reducir esta fuente de variabilidad en los resultados de los ensayos relativos a las sustancias con fuerte lipofilia (es decir, con log $P_{ow} > 3$), la bioconcentración debe expresarse en función del contenido lipídico, ademas del peso corporal total.

El contenido lipídico se establecerá, si es posible, con los mismos materiales biológicos que se utilicen para determinar la concentración de la sustancia de ensayo.

1.4. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Antes de emprender el ensayo de bioconcentración, deberán reunirse los datos siguientes respecto a la sustancia de ensayo:

a) solubilidad en el agua;

b) coeficiente de reparto octanol-agua P_{ow} (denominado también K_{ow}, determinado por un método de CLAR en A.8);

c) hidrólisis;

d) características de fototransformación en el agua bajo irradiación solar natural o artificial y en las condiciones de irradiación del ensayo de bioconcentración (3);

▼B

e) tensión superficial (para las sustancias cuyo log P_{ow} no pueda determinarse);

f) presión de vapor;

g) biodegradabilidad «fácil» (en su caso).

Será necesario también conocer la toxicidad relativa a la especie de peces utilizada en el ensayo, preferiblemente la CL_{5O} asintótica (es decir, independiente del tiempo). Es indispensable disponer de un método analítico correcto, de una exactitud, de una precisión y de una sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia de ensayo en las soluciones de ensayo y en el material biológico, así como de datos precisos sobre la preparación y la conservación de las muestras. Es necesario también conocer el límite de detección analítica de la sustancia de ensayo tanto en el agua como en los tejidos de los peces. Si se utiliza una sustancia de ensayo marcada con ^{14}C, deberá conocerse el porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

1.5. CONDICIONES DE VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que un ensayo sea válido, deberán darse las condiciones siguientes:

— la variación de temperatura será inferior a ± 2 ºC,

— la concentración de oxígeno disuelto no caerá por debajo del 60 % del nivel de saturación,

— la concentración de la sustancia de ensayo en los recipientos o armarios se mantendrá en la banda del ± 20 % de la media de los valores medidos durante la fase de absorción,

— la mortalidad y otros efectos adversos o enfermedades tanto entre los peces testigo como entre los tratados serán inferiores al 10 % al final del ensayo; cuando el ensayo se prolongue a lo largo de varias semanas o meses, la mortalidad y los otros efectos adversos en los dos conjuntos de peces deberán ser inferiores al 5 % al mes y no exceder del 30 % en total.

1.6. COMPUESTOS DE REFERENCIA

La utilización de compuestos de referencia con un potencial de bioconcentración conocido podrá ayudar al control del procedimiento experimental, en caso necesario. No se puede aún, sin embargo, recomendar ninguna sustancia específica.

1.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1. *Equipo*

Se tendrá cuidado de evitar los materiales que puedan presentar fenómenos de disolución, sorción o lixiviación o tener algún efecto adverso sobre los peces, y esto en todas las partes del equipo. Se utilizarán tanques normales rectangulares o cilíndricos, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adaptada a la tasa de carga. Se reducirá al mínimo el uso de tubos de plástico flexible. Serán preferibles los tubos de teflon (R), acero inoxidable o vidrio. La experiencia pone de manifiesto que para las sustancias que presentan fuertes coeficientes de adsorción, como los piretroides sintéticos por ejemplo, pudiera ser necesario el vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados.

▼B

1.7.2. *Agua*

Se utiliza generalmente para el ensayo en agua natural procedente de una fuente no contaminada y de calidad uniforme. El agua de dilución debe ser tal que permita la supervivencia de la especie de la especie de peces elegida, durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan ningún comportamiento ni aspecto anormales. Idealmente, se debería demostrar que las especies sometidas al ensayo pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en el agua de dilución (por ejemplo, mediante cría en laboratorio o un estudio de toxicidad sobre un ciclo biológico). El agua se caracterizará al menos por su pH, dureza, materia sólida total, carbono orgánico total y también, preferentemente, su contenido en amoniaco y en nitratos, su alcalinidad y, para las especies marinas, su salinidad. Se conocen perfectamente los parámetros importantes para el bienestar óptimo de los peces, pero el anexo 1 indica las concentraciones máximas recomendadas de una serie de parámetros relativos al agua de ensayo, dulce y salada.

Durante toda la duración de un ensayo, el agua tendrá calidad constante. El pH se mantendrá entre 6,0 y 8,5, pero durante un ensayo dado permanecerá dentro de una gama de ± 0,5 unidades de pH. Para garantizar que el agua de dilución no influye indebidamente en los resultados del estudio (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo) ni afecta negativamente al comportamiento de las poblaciones de peces, se tomarán regularmente muestras para análisis. Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, convendrá proceder, por ejemplo cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, estos análisis podrán ser menos frecuentes y sus intervalos más espaciados (por ejemplo, cada seis meses).

El contenido en partículas naturales así como el carbono orgánico total (COT) del agua de dilución será lo más bajo posible para evitar la adsorción de la sustancia de ensayo en la materia orgánica, lo que podría reducir su biodisponibilidad (4). El valor máximo admisible es de 5 mg/l para las partículas (materia seca que no atraviesa un filtro de 0,45 μm) y 2 mg/l para el carbono orgánico total (véase el anexo 1). En caso necesario, el agua se filtrará antes de usarse. La aportación de los peces (excretas) y los residuos alimentarios al contenido del agua en carbono orgánico deberá ser lo más baja posible. A lo largo del ensayo, la concentración de carbono orgánico en el recipiente del ensayo no deberá sobrepasar en más de 10 mg/l (± 20 %) la del carbono orgánico procedente de la sustancia de ensayo y, en su caso del agente de disolución.

1.7.3. *Soluciones de ensayo*

Se prepara una solución madre de la sustancia de ensayo, a una concentración adecuada. La solución madre será preparada preferiblemente por simple mezcla o agitación de la sustancia de ensayo en el agua de dilución. No se recomienda la utilización de disolventes o de dispersantes (agentes de disolución); se puede recurrir a ellos, sin embargo, en algunos casos para obtener una solución madre de la concentración necesaria. Los disolventes que pueden utilizarse son el etanol, el metanol, el éter monometílico de etilenglicol, el éter dimetílico de etilenglicol, la dimetilformamida y el trietilenglicol. Los dispersantes utilizables son Cremaphor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCOI-40. Se tomarán precauciones en caso de utilización de agentes fácilmente biodegradables, ya que estos pueden causar problemas de crecimiento bacteriano en los ensayos dinámicos. La sustancia de ensayo puede ir radiomarcada y deberá ser del nivel más alto de pureza (por ejemplo, preferiblemente > 98 %).

▼B

Para los ensayos dinámicos, un equipo aportará y diluirá continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional, sistema saturador) para conseguir las concentraciones de ensayo en los recipientes. Será preferible prever al menos cinco volúmenes de sustitución al día para cada recipiente de ensayo. Se preferirá el método dinámico, pero en caso de imposibilidad (por ejemplo, cuando los organismos del ensayo sufran efectos adversos) podrá aplicarse una técnica semiestática sí siguen cumpliéndose los criterios de validez. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución se controlarán 48 horas antes del ensayo y luego al menos diariamente durante este. Este control incluirá la determinación del flujo en cada recipiente de ensayo y garantizará que dicho flujo no varía en más del 20 % dentro de cada recipiente ni entre recipientes distintos.

1.7.4. *Selección de las especies*

Entre los criterios importantes de selección de las especies figuran el que sean de fácil disponibilidad, que puedan obtenerse de los tamaños adecuados y que puedan mantenerse satisfactoriamente en el laboratorio. Otros criterios de selección de las especies de peces son su importancia recreativa, comercial o ecológica, así como una sensibilidad comparable, haber producido buenos resultados anteriormente, etc.

En el anexo 2 figura una lista de especies recomendadas para los ensayos. Pueden utilizarse otras especies pero es posible entonces tener que adaptar el procedimiento de ensayo para obtener condiciones experimentales convenientes. En tal caso se expondrá la motivación de la elección de las especies y el método experimental elegido.

1.7.5. *Mantenimiento de los peces*

Es necesario aclimatar la población de peces durante dos semanas al menos en agua a la temperatura del ensayo y aportar una cantidad de comida suficiente y del mismo tipo que se vaya a utilizar durante el ensayo.

Después de un período de adaptación de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

— mortalidad superior al 10 % de la población en 7 días: se rechaza el lote entero,

— mortalidad entre el 5 y el 10 % de la población en 7 días: se prolonga la aclimatación durante 7 días más,

— mortalidad inferior al 5 % de la población en 7 días: se acepta el lote; si la mortalidad sobrepasa el 5 % durante los siete días siguientes, se rechaza el lote entero.

Hay que asegurarse de que los peces utilizados para los ensayos no presentan enfermedades ni anomalías observables. Se descartan todos los peces enfermos. Los peces no deben recibir tratamiento contra ninguna enfermedad durante las dos semanas que preceden al ensayo ni durante este.

▼B

1.8. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.8.1. *Ensayo preliminar*

Puede ser útil proceder a una experimentación preliminar para optimizar las condiciones de realización del ensayo definitivo, como, por ejemplo, la selección de las concentraciones de la sustancia de ensayo o la duración de las fases de absorción y de depuración.

1.8.2. *Condiciones de exposición*

1.8.2.1. Duración de la fase de absorción

Se puede prever la duración de la fase de absorción basándose en la experiencia práctica (por ejemplo, a partir de un estudio previo o de un producto químico que tenga propiedades similares de acumulación) o a partir de algunas relaciones empíricas fundadas en el conocimiento de la solubilidad en el agua o de coeficiente de reparto octanol/agua de la sustancia de ensayo (véase el anexo 3).

La fase de absorción durará 28 días salvo si puede demostrarse que se alcanza antes el equilibrio. Si no se llega al estado de equilibrio en el plazo de 28 días, se prolongará la fase de absorción y se procederá a otras mediciones hasta conseguir el estado de equilibrio, o durante 60 días si esto supone un plazo menor.

1.8.2.2. Duración de la fase de depuración

La mitad de la duración de la fase de absorción es generalmente suficiente para que se produzca una reducción conveniente (por ejemplo, 95 %) de la carga corporal de la sustancia de ensayo (véanse las explicaciones del cálculo en el anexo 3). Si el tiempo necesario para llegar a una pérdida del 95 % es excesivamente largo, sobrepasando por ejemplo dos veces la duración normal de la fase de absorción (es decir, más de 56 días), se podrá utilizar un período más corto (hasta que la concentración de la sustancia de ensayo sea inferior al 10 % de la concentración en el estado de equilibrio). Sin embargo, para las sustancias con prepiedades de absorción y depuración más complejas que el modelo de peces con un único compartimento, que da una cinética de primer orden, se aplicarán fases de depuración más largas para determinar las constantes de la velocidad de pérdida. Sin embargo, este plazo de tiempo puede regirse por el período durante el cual la concentración de la sustancia de ensayo en los peces permanece por encima del límite de detección analítico.

1.8.2.3. Número de peces del ensayo

El número de peces por concentración del ensayo debe elegirse de modo que, como mínimo, se disponga de cuatro peces por muestra en cada muestreo. Si se desea una estadística más fina, deberá aumentar el número de peces por muestra.

Si se utilizan peces adultos, hay que indicar si son machos o hembras o si se utilizan los dos sexos en el experimento. En este último caso, antes de empezar la exposición, será necesario comprobar que no son significativas las diferencias de contenido lipídico entre sexos; podrá ser necesario reunir todos los machos y todas las hembras.

▼B

En todos los ensayos se elegirán peces de peso similar, de modo que el peso del más pequeño no sea inferior a dos tercios del peso del mayor. Pertenecerán a la misma clase de edad y procederán de la misma fuente. Dado que, al parecer, el peso y la edad de un pez tienen a veces efectos notables sobre los valores de FBC (1), estos datos se registrarán con precisión. Se recomienda pesar una submuestra de la población de peces antes del ensayo, para calcular el peso medio.

1.8.2.4. Carga

Se utiliza una relación elevada agua/peces con el fin de minimizar la reducción de C_w debida a la introducción de los peces al principio del ensayo, y también para evitar el descenso de la concentración de oxígeno disuelto. Es importante que la tasa de carga sea adaptada a la especie utilizada para el ensayo. De todos modos, se recomienda una tasa de carga de 0,1-1,0 g de peces (peso húmedo) por litro de agua al día. Se pueden realizar cargas de tasa elevada si se demuestra que la concentración requerida de sustancia de ensayo puede mantenerse en la banda del ± 20 %, y que la concentración de oxígeno disuelto no cae por debajo del 60 % del nivel de saturación.

Se tendrá en cuenta el hábitat normal de la especie de peces al elegir la tasa de carga. Los peces bentónicos, por ejemplo, pueden necesitar un acuario que tenga más superficie de fondo que las especies pelágicas, para un mismo volumen de agua.

1.8.2.5. Alimentación

Durante los períodos de aclimatación y de ensayo, se alimentará a los peces con una dieta conveniente que tenga un contenido conocido en lípidos y proteínas totales, en cantidades suficientes para mantenerlos en buena salud y conservar el peso corporal. Se alimentará a los peces diariamente durante los períodos de aclimatación y de ensayo en la proporción de alrededor del 1 o 2 % del peso corporal cada día; se mantiene así en la mayoría de las especies una concentración lipídica de un nivel relativamente constante durante el ensayo. La cantidad de comida deberá volver a calcularse una vez por semana, por ejemplo, con el fin de mantener constantes el peso corporal y el contenido lipídico. Para ese cálculo, el peso de los peces de cada recinto de ensayo se evaluará a partir del peso de los peces muestreados últimamente en ese recinto. No hay que pesar los peces que permanecen en el recinto.

La comida no consumida y los excrementos son evacuados de los recipientes de ensayo mediante sifón cada día poco después de la alimentación (30 minutos a una hora). Los recipientes se tendrán lo más limpios posible a lo largo del ensayo de modo que la concentración de materia orgánica permanezca al nivel más bajo posible, puesto que la presencia de carbono orgánico puede limitar la biodisponibilidad de la sustancia de ensayo (1).

Como muchos alimentos son derivados de harinas de pescado, se analizarán para determinar su contenido en sustancia de ensayo. Es conveniente también analizar el contenido de estos alimentos en plaguicidas y metales pesados.

▼B

1.8.2.6. Iluminación y temperatura

El período de iluminación es generalmente de 12 a 16 horas y la temperatura (± 2 ºC) corresponderá a la especie utilizada (véase el anexo 2). Se definirán claramente el tipo y las características de la iluminación. Será necesario prestar atención a la posible fototransformación de la sustancia de ensayo en las condiciones de irradicación del estudio. Se utilizará un alumbrado adecuado que no exponga a los peces a fotoproductos no naturales. En algunos casos, puede ser conveniente utilizar un filtro para eliminar los rayos UV por debajo de 290 nm.

1.8.2.7. Concentraciones del ensayo

Se exponen los peces en condiciones dinámicas a dos concentraciones al menos de la sustancia de ensayo en agua. Normalmente, la concentración mas alta de la sustancia de ensayo será del 1 % de su CL_{50} aguda asintótica, y al menos diez veces superior a su límite de detección en el agua por el método de análisis elegido.

La concentración mas alta del ensayo puede establecerse también dividiendo la CL_{50} a 96 horas por una relación adecuada aguada/crónica (las relaciones adecuadas de algunos productos químicos pueden ir de 3 a 100). Si es posible, la otra u otras concentraciones deben elegirse de modo que la diferencia con la antes citada alcance un factor de diez. En caso de imposibilidad debido al criterio del 1 % de la CL_{50} y del límite analítico, podrá utilizarse un factor inferior a diez o se pensará en el uso de una sustancia radiomarcada con ^{14}C. Ninguna concentración podrá superar la solubilidad en agua de la sustancia de ensayo.

Cuando se utilice un agente de disolución, su concentración no deberá sobrepasar 0,1 ml/l y deberá ser idéntica en todos los recipientes del ensayo. Debe conocerse su contribución, junto con la de la sustancia de ensayo, al contenido global de carbono orgánico en el agua del ensayo. Sin embargo, se hará todo lo posible para evitar recurrir a este tipo de materiales.

1.8.2.8. Controles

Se utilizará un control (testigo) del agua de dilución o, en su caso, un control con el agente de disolución, además de la serie de ensayo, en la medida en que se haya establecido que el agente no tiene ningún efecto sobre los peces. En caso contrario, se establecerán ambos controles.

1.8.3. *Frecuencia de las medidas de la calidad del agua*

Durante el ensayo se medirán en todos los recipientes el oxígeno disuelto, el COT, el pH y la temperatura. La dureza total, y la salinidad eventualmente, se medirán en los controles y en un recipiente que contenga la concentración más alta. Por lo menos, el oxígeno disuelto y eventualmente la salinidad se medirán tres veces —al principio, hacia el medio y al final de período de absorción— y una vez por semana durante el período de depuración. El COT se medirá al principio del ensayo (24 y 48 horas antes del comienzo de la fase de absorción), antes de la adición de los peces y al menos una vez por semana durante los períodos de absorción y de depuración. La temperatura se medirá diariamente, el pH al principio y al final de cada período y la dureza una vez en cada ensayo. La temperatura se medirá preferiblemente de forma continua en un recipiente al menos.

▼B

1.8.4. *Muestreo y análisis de los peces y del agua*

1.8.4.1. Calendario de muestreo de los peces y del agua

Se tomará agua de los recipientes de ensayo para determinar la concentración de la sustancia de ensayo antes de la introducción de los peces y durante las fases de absorción y de depuración. Por lo menos, el agua se tomará al mismo tiempo que los peces y antes de darles de comer. Durante la fase de absorción, se determinarán las concentraciones de sustancia de ensayo para comprobar que satisfacen los criterios de validez.

Se muestrearán los peces en cinco ocasiones al menos durante la fase de absorción y en cuatro ocasiones al menos durante la fase de depuración. Como a veces es difícil calcular una estimación razonablemente precisa del FBC a partir de este número de muestras, en particular cuando hay una cinética de depuración distinta de la simple de primer orden, puede ser recomendable muestrear con mayor frecuencia en los dos períodos (véase el anexo 4). Las muestras suplementarias se conservarán y analizarán solamente si los resultados de la primera serie de análisis se revelan insuficientes para el cálculo del FBC con la precisión requerida.

En el anexo 4 se encuentra un ejemplo de calendario de muestreo aceptable. Pueden establecerse otros calendarios fácilmente sobre la base de otros valores supuestos del P_{ow} para calcular el tiempo de exposición que corresponde a una absorción del 95 %.

Se prosigue el muestreo durante la fase de absorción hasta el establecimiento de un estado de equilibrio o durante 28 días, si esto supone un plazo menor. Si no se llega a un estado de equilibrio en 28 días, el muestreo continúa hasta la obtención de un estado de equilibrio o durante 60 días, si esto supone un plazo menor, Antes de empezar la fase de depuración, se trasladan los peces a los tanques limpios.

1.8.4.2. Muestreo y preparación de las muestras

Se toman las muestras de agua destinadas a los análisis, por ejemplo mediante sifonado a través de un tubo inerte desde un punto central del recinto de ensayo. Puesto que parece que no siempre se puede separar ni por centrifugación ni por filtración la fracción no biodisponible de la sustancia de ensayo de la que es biodisponible (en particular en el caso de los productos químicos superlipofílicos, es decir, que tienen un log $P_{ow} > 5$) (1) (5), las muestras pueden no someterse a estos tratamientos.

En su lugar, será necesario procurar que los tanques se mantengan lo más limpios posible y que el contenido en carbono orgánico total se mida a lo largo de las fases de absorción y de depuración.

Se toma un número conveniente de peces (normalmente 4 como mínimo) de cada recipiente de ensayo en cada momento de muestreo. Los peces tomados se lavan rápidamente con agua, se secan con material absorbente, y se sacrifican instantáneamente de la manera más adecuada e incruenta posible, y luego se pesan.

Es preferible analizar los peces y el agua inmediatamente después del muestreo para evitar toda degradación u otras pérdidas y para calcular aproximadamente las tasas de absorción y de depuración mientras el ensayo continúa. El análisis inmediato evita también retrasos en la determinación del momento en que se alcanza una meseta.

▼B

A falta de un análisis inmediato, las muestras se conservan según un método conveniente. Antes del principio del estudio, se reunirá información sobre el método de conservación adecuado de la sustancia de ensayo correspondiente como, por ejemplo, congelación, mantenimiento a 4 ºC, duración de la conservación, extracción, etc.

1.8.4.3. Calidad del método analítico

Como la totalidad del procedimiento se regula principalmente por la exactitud, la precisión y la sensibilidad del método analítico utilizado para la sustancia de ensayo, es necesario controlar experi-mentalmente que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia de ensayo tanto en el agua como en los peces son satisfactorias en el método particular. Ha de comprobarse también que la sustancia de ensayo no es detectable en el agua de dilución utilizada.

En caso necesario, los valores de C y C, derivados de los ensayos se corregirán a la luz de los valores de recuperación y de fondo de los controles. Las muestras de peces y de agua se manejan permanentemente para minimizar las contaminaciones y las pérdidas (derivadas, por ejemplo de la adsorción por el equipo de muestreo).

1.8.4.4. Análisis de los peces muestreados

Si se utilizan para el ensayo materiales radiomarcados, se puede analizar el marcado radiactivo total (es decir, compuestos de origen y metabolitos) o se pueden purificar las muestras de modo que sea posible analizar separadamente los compuestos de origen. Por otro lado, los principales metabolitos pueden caracterizarse en el estado de equilibrio al final de la fase de absorción, si esto supone un plazo menor. Si el FBC en términos de residuos radiomarcados totales es ≥ 1 000 %, puede ser bueno (y, para algunas categorías de productos químicos como los plaguicidas, muy recomendable), identificar y cuantificar los productos de degradación que representen ≥ 10 % de los residuos totales en los tejidos de los peces en el estado de equilibrio. Si estos productos que representan > 10 % de los residuos totales radiomarcados en los tejidos de peces se identifican y cuantifican, se recomienda entonces identificarlos y cuantificarlos también en el agua del ensayo.

La concentración de la sustancia de ensayo debería generalmente determinarse en cada pez pesado aparte. Si eso no es posible, se podrán poner conjuntamente las muestras en cada muestreo, pero esta mezcla limita los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si se desean un procedimiento y una potencia estadísticos, convendrá entonces utilizar en el ensayo un número adecuado de peces para conciliar el procedimiento de mezcla con la precisión estadística deseada (6) (7).

El FBC se expresará en función del peso húmedo total y también, en caso de sustancias muy lipofílicas, en función del contenido lipídico. El contenido lipídico de los peces se determina si es posible en cada muestreo. Se utilizarán métodos adaptados para determinar el contenido en lípidos (referencias 8 y 2 del anexo 3). Se puede recomendar la técnica de extracción por cloroformo/metanol como método normal (9). Los diversos métodos no dan valores idénticos (10), por lo que es importante precisar bien el método utilizado. El análisis de los lípidos se hará, si es posible, con el mismo extracto que el consagrado al análisis de la sustancia de ensayo, puesto que los lípidos deben a menudo retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía. El contenido lipídico de los peces (en rng/kg de peso húmedo) al final del experimento no debería separarse de la del principio en más del ± 25 %. El porcentaje en solidos de los tejidos también se indicará para permitir la conversión de la concentración lipídica de peso húmedo a la de peso seco.

▼B

2. **DATOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

La curva de absorción de la sustancia de ensayo se obtiene representando su concentración en los peces (o tejidos específicos) durante la fase de absorción en función del tiempo, con una escala aritmética. Si la curva alcanza una meseta, es decir, adopta aproximadamente una disposición asintótica al eje del tiempo, se calculará del siguiente modo el FBC_{SS} en el estado de equilibrio:

$$\frac{C_f \text{ en estado de equilibrio (media)}}{C_w \text{ en estado de equilibrio (media)}}$$

Cuando no se llega a ningún estado de equilibrio, es posible calcular un FBC_{SS} de una precisión suficiente para la evaluación de los riesgos a partir de un «estado de equilibrio» al 80 % (1,6/k,) o 95 % ($3,0/k_2$) del equilibrio.

También se determina el factor de concentración (FBCJ como la relación de k_1/k_2 las dos constantes cinéticas de primer orden. La constante de la velocidad de depuración (k_2) se determina generalmente a partir de la curva de depuración (es decir, representación de la disminución de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces en función del tiempo). La constante de la velocidad de absorción (k_1) se calcula entonces en función de k_2 y de un valor de C_f derivado de la curva de absorción (véase también el anexo 5). El método de elección para obtener FBC_k y las constantes de velocidad k, y k_2 es recurrir a métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales (11). Alternativamente, se pueden utilizar métodos gráficos para calcular k_1 y k_2. Si la curva de depuración es evidentemente de orden distinto del primero, entonces convendrá utilizar modelos más complejos (véanse las referencias en el anexo 3) y buscar el consejo de un bioestadístico.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se interpretarán con precaución cuando las concentraciones medidas de las soluciones de ensayo se encuentren a niveles cercanos al límite de detección del método de análisis.

La claridad de definición de las curvas de absorción y de pérdida indican la buena calidad de los datos de bioconcentración. La variación de las constantes de absorción/depuración entre las dos concentraciones de ensayo debería ser inferior al 20 %. Las diferencias notables observadas en las velocidades de absorción/depuración entre las dos concentraciones de ensayo se registrarán y explicarán si es posible. En general el límite de confianza del FBC se acerca al ± 20 % en los estudios bien diseñados.

3. **INFORME**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

3.1. SUSTANCIA DE ENSAYO

— naturaleza física y, en su caso, propiedades físico-químicas,

— datos de identificación química (incluido el contenido en carbono orgánico, si procede),

— en caso de marcado radiactivo, posición precisa de los átomos marcados y porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

▼B

3.2. ESPECIES UTILIZADAS

— Denominación científica, estirpe, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, rango de tamaños, etc.

3.3. CONDICIONES DEL ENSAYO

— procedimiento seguido (por ejemplo, dinámico o semiestático),

— tipo y características del alumbrado utilizado y períodos de iluminación,

— diseño del ensayo (por ejemplo, número y tamaño de los recipientes de ensayo, régimen de sustitución de los volúmenes de agua, numero de grupos y de peces por grupo, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y depuración, frecuencia de los muestreos de peces y de agua),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (se indicarán el agente de disolución, su concentración y su contribución al contenido en carbono orgánico del agua del ensayo, en su caso),

— las concentraciones de ensayo nominales, las medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo y su método de obtención,

— fuente del agua de dilución, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de las posibles demostraciones de la aptitud de los peces utilizados para vivir en esta agua y características de esta: pH, dureza, temperatura, concentración en oxígeno disuelto, niveles de cloro residual (si se mide), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (en su caso), y todas las demás medidas realizadas,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, dureza, COT, temperatura y concentración en oxígeno disuelto,

— información precisa sobre la alimentación (por ejemplo tipo de comida, fuente, composición —al menos contenido en lípidos y proteínas si es posible— cantidad dada y frecuencia),

— información sobre el tratamiento de las muestras de peces y de agua, incluidos datos de preparación, almacenamiento, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia de ensayo y del contenido en lípidos (si se mide).

3.4. RESULTADOS

— resultados de los eventuales estudios preliminares efectuados,

— mortalidad de los peces de control y de los peces de cada recinto de ensayo y todos los comportamientos anormales observados,

— contenido lipídico de los peces (si se determina con motivo del ensayo),

— curvas (con todos los datos medidos) que muestren la absorción y la depuración de las sustancias de ensayo en los peces, el tiempo de acceso al estado de equilibrio,

▼B

— C_f y C_w (con desviación típica y gama, en su caso) en el momento de cada muestreo [C_f expresado en µg/g de peso húmedo (ppm) de todo el animal o de algunos de sus tejidos, por ejemplo lípidos, y C_w en (µg/ml (ppm)] valores de C_w de la serie de control (indicar también la concentración de fondo),

— factor de bioconcentración en el estado de equilibrio (FBC_{SS}) o factor de concentración cinético (FBC_k) y, en su caso, límites de confianza del 95 % de las constantes de la velocidad de absorción y de depuración (pérdida) todo expresado respecto al cuerpo entero y al contenido total en lípidos, si se mide, del animal (o de sus tejidos especificados), límites de confianza y desviación típica (si se dispone de ella), métodos de cálculo/análisis de los datos para cada concentración de sustancia de ensayo utilizada,

— cuando se utilicen sustancias radiomarcadas, podrá exponerse la acumulación de todos los metabolitos detectados sí es necesario,

— toda observación inusual relativa al ensayo, toda divergencia respecto a estos procedimientos y toda la información pertinente.

Minimizar los resultados «no detectado al límite de detección» mediante la aplicación de un método de ensayo preliminar y el diseño experimental, puesto que estos resultados son inutilizables para los cálculos de las constantes de velocidad.

4. **REFERENCIAS**

(1) Connell D.W. (1988). «Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms». *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, pp. 117-156.

(2) Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). N*onlinear dependence of fish bioconcentration on n-octano/water partition coefficient. SAR and OSAR in Environmental Research.* 1, 29-390.

(3) OECD, París (1996). *Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety guidance document series on Testing and Assessment of Chemicals* No 3.

(4) Kristensen P. (1991). *Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods: influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals.* Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) *Great Lake Water Ouality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors.* July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. *Plaguicide analytical manual,* 1, 5600 Fisher's Lane Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l). «Analysis of Human or Animal Adipose Tissue», *in Analysis of Plaguicide Residues in Human and Evironmental Samples,* Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) en «The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic invironment: degradation, toxicity, bioaccumulation», Ch. 2.3, Part II. Government Publi- shing Office, The Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995). *Limn.* & *Oceanogr.* 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C, Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). *Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol.* Chem. 10, pp. 1431-1436.

(11) CEC. *Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through metbod-Ring test programme, 1984-1985. Final report March 1987.* Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTME E-1022-84 (Reapproved 1988) *Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fisches and Saltwater Bivalve Molluscs.*

▼B

Anexo 1

Características químicas aceptables del agua de dilución

	Sustancia	Límite de concentración
1	Materia en suspensión	5 mg/l
2	Carbono orgánico total	2mg/l
3	Amoníaco no ionizado	1 µg/l
4	Cloro residual	10 ng/l
5	Plaguicidas organofosforados totales	50 µg/l
6	Plaguicidas organoclorados totales más policlorobifenilos	50 µg/l
7	Cloro orgánico total	25 ng/l
8	Aluminio	1 ng/l
9	Arsénico	1 µg/l
10	Cromo	1 µg/l
11	Cobalto	1 µg/l
12	Cobre	1 µg/l
13	Hierro	1 µg/l
14	Plomo	1 µg/l
15	Níquel	1 µg/l
16	Cinc	1 µg/l
17	Cadmio	100 ng/l
18	Mercurio	100 ng/l
19	Plata	100 µg/l

▼B

Anexo 2

Especies de peces recomendadas para los ensayos

	Especies recomendadas	Gamas de temperaturas recomendadas para los ensayos (en ºC)	Longitud total recomendada de los animales utilizados (en cm)
1	Danio rerio ([1]) *(Teleostei, Cyprinidae)* (Hamilton-Buchanan) pez cebra	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas *(Teleostei, Cyprinidae)* (Rafinesque) pez cabeza gorda	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio *(Teleostei, Cyprinidae)* (Linnaeus) carpa común	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes *(Teleostei, Poeciliidae)* (Temminck y Schlegel) medaka	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata *(Teleostei, Poeciliidae)* (Peters) guppy	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus *(Teleostei, Cenirarchidae)* (Rafinesque) agallas azules	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss *(Teleostei Salmortidae)* (Walbaum) trucha arco iris	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus *(Teleostei, Gasterosteidae)* (Linnaeus) espinoso	18-20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B, Vol. 252, p. 231.

Se han utilizado distintas especies marinas y de estuarios en algunos países como, por ejemplo:

Leiostomus xanthurus

Cyprinodon variegatus,

Menidia beryllina

Cymatogaster aggregata,

Parophrys vetulus

Leptocottus armatus,

Gasterosteus aculeatus

Dicentracus labrax

Alburnus alburnus.

Aprovisionamiento

Los peces de agua dulce enumerados en el cuadro anterior son fáciles de criar o están fácilmente disponibles a lo largo del año, mientras que la disponibilidad de las especies marinas o de estuario se limita en parte a los países correspondientes. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en laboratorio, en condiciones donde las enfermedades y los parásitos están bajo control; los animales utilizados serán, pues, sanos y de origen conocido. Estos peces se encuentran en muchas partes del mundo.

▼B

Anexo 3

Previsión de la duración de las fases de absorción y de depuración

Previsión de la duración de la fase de absorción

Antes de realizar el ensayo, podrá obtenerse una estimación de k_2 y, en consecuencia, un porcentaje del tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, a partir de relaciones empíricas entre k_3 y el coeficiente de reparto n-octanol/agua (P_{ow}) o k_2 y la solubilidad en el agua (s).

Se puede estimar k_2 (días^{-1}), por ejemplo a partir de la relación empírica siguiente (1):

$\log_{10}k_2 = - 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47$ ($r^2 = 0{,}95$) (ecuación 1)

Para las otras relaciones, véase la referencia (2).

Si el coeficiente de reparto (P_{ow}) es desconocido, se procederá a una estimación (3) a partir de la solubilidad de la sustancia en el agua según:

$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710$ ($r^2 = 0{,}994$) (ecuación 2)

donde s = solubilidad (moles/l): (n = 36).

Estas relaciones solo se aplican a los productos químicos cuyos valores de log P_{ow} se sitúan entre 2 y 6,5 (4).

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede obtenerse, aplicando la estimación de k_2, de la ecuación cinética general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

o, si C . es constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{(ecuación 3)}$$

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} . C_w \text{ or } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

La relación k_1/k_2 . C_w se acerca entonces a la concentración en el pez en el «estado de equilibrio» (C_{fs}).

La ecuación 3 puede así transcribirse:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ o } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{(ecuación 4)}$$

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede preverse aplicando la ecuación 4, cuando k_2 se estima con ayuda de las ecuaciones 1 o 2.

▼B

A título indicativo, la duración óptima estadísticamente de la fase de absorción que permite obtener datos estadísticamente aceptables (FBC_k) es el período necesario para que la curva del logaritmo de la concentración de la sustancia de ensayo en el pez representado frente al tiempo lineal, llegue a su punto medio, o 1,6/k, o un 80 % del estado de equilibrio, pero sin sobrepasar $3,0/k_2$ o un 95 % del estado de equilibrio (7).

El tiempo para llegar al 80 % del estado de equilibrio es (ecuación 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ o } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(ecuación 5)}$$

Del mismo modo, para un 95 % del estado de equilibrio:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[equation 6]}$$

Por ejemplo, la duración de la fase de absorción (abs.) de una sustancia de ensayo que tenga un log P_{ow} = 4 sería (con las ecuaciones 1, 5 y 6):

$\log_{10}k_2$ = - 0,414.(4) + 1,47 $\qquad$ k_2 = 0,652 días^{-1}

abs. (80 %) = 1,6/0,652, es decir, 2,45 días (59 horas)

o abs. (95 %) = 3,0/0,652, es decir, 4,60 días (110 horas)

Del mismo modo, para una sustancia de ensayo con s = 10^{-5} mol/l (log(s) = - 5,0), la duración de la absorción sería (ecuaciones 1, 2, 5 y 6):

$\log_{10}$ (P_{ow}) = -0,862. (-5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10}k_2$ = -0,414. (5,02) + 1,47

k_2 = 0,246 días^{-1}

abs. (80 %) = 1,6/0,246, es decir, 6,5 días (156 horas)

o abs. (95 %) = 3,0/0,246, es decir, 12,2 días (293 horas)

Se utiliza, como alternativa, la expresión:

t_{eq} = 6,54 x 10^{-3} P_{ow} + 55,31 (horas)

para calcular el tiempo de llegada al estado de equilibrio efectivo (4).

Previsión de la duración de la fase de depuración

Se podrá también prever el tiempo necesario para que (a carga corporal se reduzca a un determinado porcentaje de la concentración inicial gracias a la ecuación general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden) (1) (8).

Para la fase de depuración, C_w se supone nulo. La ecuación puede reducirse a:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ o } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

donde $C_{f.o}$ es la concentración al principio del período de depuración. Se llegará a una depuración del 50 % en el tiempo (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ o } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Del mismo modo, el 95 % de depuración se alcanzará en el tiempo:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Si se utiliza el 80 % de la absorción para el primer período ($1,6/k_2$) y el 95 % de perdida en la fase de depuración ($3,0/k_2$), entonces la fase de depuración será aproximadamente el doble de la depuración de la fase de absorción.

Es importante, sin embargo, tener en cuenta que estas estimaciones se basan en la hipótesis de que los esquemas de absorción y de depuración siguen una cinética de primer orden. Si es evidente que no se cumple esta condición, deberán emplearse modelos más complejos [por ejemplo, la referencia (1)].

REFERENCIAS

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) *Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fisb.* Environ. Toxicol. and Ch. 1, pp. 309-320.

(2) Kristensen P. (1991) *Bioconcentration is fisb: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals.* Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982). *Partitionmg of organic compounds in octanol-water systems.* Environ: Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). *Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinewtics with fish.* Wat. Res. 22 (6), pp. 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). *Transactions of the American Fisheries Society,* 104 (4), pp. 785-792.

(6) Ernst W. (1985). «Accumulation in Acuatic Organisms». In: *Appraisal of tests to predict the environe-mental behaviour of chemicah.* Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, pp. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd, N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977). *Guidelines for the optimal design of experiments lo estimate parameters in first order kenetic models,* Can. J. Chem. Eng. 55, pp. 614-622.

(8) Kónemann H. and Van Leeuwen K. (1980). *Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six Chlorobenzenes by Guppies.* Chemosphere, 9, pp. 3-19,

▼B

Anexo 4

Ejemplos teóricos de calendarios de muestreo para los ensayos de bioconcentración de sustancias con log P_{ow} = 4

Muestreos de peces	Calendario de muestreo		Número de muestra	Número de peces por muestra
	Frecuencia mínima requerida (días)	Muestreos suplementarios		
Fase de absorción	- 1 0		2 (*) 2	añadir 45-80 peces
V	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3 [a]	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4[a]	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5[a]	4,7		2	6
Fase de depuración				Trasladar los peces a agua libre del producto de ensayo
6[a]	5,0	5,3		4 (4)
7[a]	5,9	7,0		4 (4)
8[a]	9,3	11,2		4 (4)
9[a]	14,0	17,5		6 (4)

(*) Tomar el agua después de transferir al menos 3 volúmenes de recinto.

Los valores entre paréntesis son los números de muestras (agua, peces) que se toman si se procede a un muestreo suplementario.

Nota: La estimación antes del ensayo de k_n para un log P_{ow} de 4,0 es de 0,652 días^{-1} La duración total de la experiencia se fija en: 3 x abs. = 3 x 4,6 días, o sea 14 días. Remitirse al anexo 3 para el cálculo de «abs.».

▼B

Anexo 5

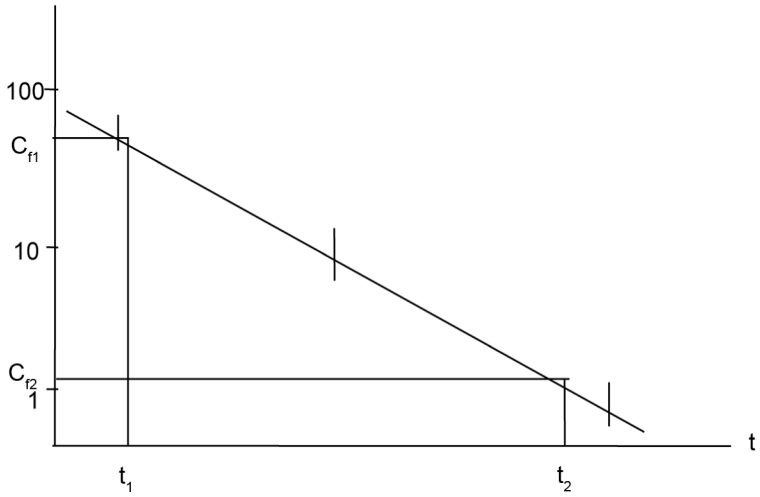
Discriminación de los modelos

Se supone que la mayoría de los datos de bioconcentración se describen «razonablemente» bien con un modelo simple de dos compartimentos/dos parámetros, según indica la curva rectilínea que une aproximadamente los puntos de las concentraciones medidas en los peces durante la fase de depuración, cuando se representan sobre papel semilogarítmico [cuando estos puntos no pueden unirse con una recta, conviene recurrir a modelos más complejos; véase, por ejemplo, Spacie and Hamelink, referencia (1) en el anexo 3].

Método gráfico de determinación de la constante de la velocidad de depuración (pérdida) k_2

Llevar sobre papel semilogarítmico la concentración de la sustancia de ensayo encontrada en cada muestra de peces, frente al tiempo de muestreo. La pendiente de esta recta es k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Atención: las divergencias en relación con esta línea recta pueden indicar un régimen de depuración más complejo que una cinética de primer orden. Puede aplicarse un método gráfico para solucionar los tipos de depuración que se desvían de la cinética de primer orden.

Método gráfico de determinación de la constante de la velocidad de absorción k_1

Dada K_2, se calcula k_1 del modo siguiente:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(ecuación 1)}$$

Se lee el valor de C_t en el punto medio de la curva de absorción suavizada obtenida con los datos cuando se representa la concentración logarítmica frente al tiempo (en escala aritmética).

▼B

Método de cálculo informático de las constantes de las velocidades de absorción y de depuración (pérdida)

Para obtener el factor de bioconcentración y las constantes de velocidad k_1 y k_2 se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales. Estos programas establecen los valores de k_1 y de k_2 en función de un conjunto de datos secuenciales de concentración en el tiempo y del modelo:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(ecuación 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{(ecuación 2)}$$

donde t_c = tiempo al final de la fase de absorción.

Este proceso desemboca en una estimación de la desviación típica para k_1 y k_2

Puesto que k_2 puede estimarse en la mayoría de los casos a partir de la curva de depuración con una precisión relativamente grande, y puesto que existe una fuerte correlación entre los dos parámetros k_1 y k_2 si se estiman simultáneamente, puede ser deseable calcular en primer lugar k_2 a partir de los datos de depuración solamente, y luego calcular k_1 a partir de los datos de absorción con ayuda de una regresión lo lineal.

▼B

C.14. **ENSAYO DE CRECIMIENTO EN PECES JUVENILES**

1. **MÉTODO**

El presente método de ensayo de toxicidad para el crecimiento reproduce las directrices del documento OCDE TG 215 (2000).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo tiene por objeto determinar los efectos de la exposición prolongada a sustancias químicas sobre el crecimiento de peces juveniles y se funda en un método elaborado y sometido a un estudio interlaboratorios (1) (3) en la Unión Europea para valorar los efectos de las sustancias químicas en el crecimiento de juveniles de trucha arco iris *(Oncorhynchus mykiss)* en condiciones dinámicas. Pueden emplearse otras especies de peces bien estudiadas. Por ejemplo, se dispone de una cierta experiencia en ensayos de crecimiento con el pez cebra *(Danio rerio)*(2) (4) (5) y el medaka *(Oryzias (atipes)* (6) (7) (8).

Véase también la parte C de la introducción general.

1.2. DEFINICIONES

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): concentración más baja de sustancia de ensayo con la que se observa un efecto significativo (para $p < 0,05$) en comparación con el control. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de provocar un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración.

Concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC): concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC.

EC_X: en el presente método de ensayo, concentración de sustancia de ensayo que produce una variación del x % en la tasa de crecimiento de los peces respecto a los controles.

Tasa de carga: peso húmedo de peces por unidad de volumen de agua.

Densidad de población: número de peces por unidad de volumen de agua.

Tasa de crecimiento específico de cada pez: tasa de crecimiento de un pez respecto a su peso inicial.

Tasa de crecimiento específico medio por recipiente: tasa de crecimiento medio de la población de un recipiente a una concentración determinada.

Tasa de crecimiento pseudoespecífico: tasa de crecimiento individual respecto al peso inicial medio de la población del recipiente.

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Después de haberlos pesado, se colocan peces juveniles en fase de crecimiento exponencial en recipientes de ensayo y se exponen a una gama de concentraciones subletales de la sustancia de ensayo disuelta en agua, preferiblemente en condiciones dinámicas (flujo continuo) o, de no ser posible, en condiciones semiestáticas adecuadas (renovación discontinua). La duración del ensayo es de 28 días. Se proporciona alimento a los peces todos los días. La ración alimentaria se determina en función del peso inicial de los peces y puede volverse a calcular transcurridos 14 días. Al final del ensayo, se vuelven a pesar los peces. Se analizan los efectos sobre la tasa de crecimiento mediante un modelo de regresión con el fin de estimar la concentración que produciría una variación del x % de dicha tasa, es decir, EC_x (EC_{10}, EC_{20} o EC_{30}, por ejemplo). También pueden compararse los datos con los valores de los controles para determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y. de ahí, la concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC).

1.4. INFORMACIÓN RELATIVA A LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Debe disponerse de los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el método C.1) efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo y conocerse la solubilidad en el agua y la presión de vapor de la sustancia de ensayo. Para calcular la cantidad de sustancia en las soluciones de ensayo debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo limite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe.

La información útil para establecer las condiciones de ensayo incluye la fórmula estructural de la sustancia de ensayo, su pureza, estabilidad en el agua y a la luz, pK_a, P_{ow} y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la mortalidad en los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo,

— el peso medio de los peces de los controles debe haber aumentado lo suficiente para poder detectar la variación mínima de la tasa de crecimiento que se considere significativa. Un ensayo interlaboratorios (3) ha puesto de manifiesto que, en el caso de la trucha arco iris, al cabo de 28 días el peso medio de los peces de los controles ha de haberse incrementado al menos en la mitad (50 %) de su peso medio inicial. Por ejemplo, si el peso inicial es de 1 g/pez (= 100 %), el peso final tras 28 días ha de ser ≥ 1,5 g/pez (≥ 150 %),

— la concentración de oxígeno disuelto ha de ser, al menos, del 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo,

— en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de ± 1 ºC entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 ºC dentro de las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (apéndice 1).

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

Se empleará el equipo común de laboratorio y, en particular:

a) medidores de oxígeno y de pH;

▼B

b) equipo para determinar la dureza y alcalinidad del agua:

c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, preferiblemente continua:

d) recipientes de material químicamente inerte y de capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el punto 1.8.5 y el apéndice 1);

e) balanza suficientemente precisa (precisión de ± 0,5 %).

1.6.2. **Agua**

Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie sometida a ensayo muestre una tasa de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. La calidad ha de ser constante a todo lo largo del ensayo. El pH debe hallarse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 pH unidades. Se recomienda una dureza superior a 140 mg/l ($CaCO_3$). Deben tomarse periódicamente muestras para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo). Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl y SO_4), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses). En el apéndice 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

1.6.3. **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de la solución madre.

La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia de ensayo en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad para lograr la concentración adecuada de solución madre.

En algunos casos puede ser necesario usar disolventes o dispersantes (agentes de disolución) para obtener una solución madre a la concentración deseada. Puede entonces utilizarse como disolvente acetona, etanol, meta-nol. dimetilsulfóxido, dimetilformamida o trietílenglicol, y como dispersante Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % o HCO-40. Deben tomarse precauciones si se emplean agentes fácilmente biodegrada-bles (como la acetona) y/o muy volátiles, pues estos pueden dar lugar a una proliferación bacteriana en los ensayos dinámicos. Si se emplea un agente de disolución, no debe actuar de forma significativa sobre el crecimiento de los peces ni producir efectos nocivos visibles en los juveniles, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo contenga disolvente.

▼B

Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no debería variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Con arreglo a un ensayo interlaboratorios (3), en el caso de la trucha arco iris se considera adecuado un régimen de renovación del agua durante el ensayo equivalente a 6 l/g de pez/día (véase el punto 1.8.2.2).

En el caso de los ensayos semiestáticos, la frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad de la sustancia de ensayo, si bien se recomienda renovarlo todos los días. Si los ensayos preliminares de estabilidad (véase el punto 1.4) ponen de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, queda fuera del intervalo del 80 al 120 % de la concentración nominal o cae por debajo del 80 % de la concentración medida al inicio) entre dos renovaciones, debe plantearse la realización de un ensayo dinámico.

1.6.4. **Selección de la especie**

Se recomienda realizar el ensayo con la trucha arco iris *(Oncorhynchus mykiss),* pues es la especie que más se ha empleado en el ensayo interlaboratorios (1) (3). También es posible emplear otras especies bien estudiadas, aunque entonces podría ser necesario adaptar el procedimiento para que las condiciones de ensayo sean adecuadas. Por ejemplo, se dispone asimismo de experiencia con el pez cebra *(Danio rerio)* (4) (5) y el medaka *(Oryzias latipes)* (6) (7) (8). En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

1.6.5. **Preparación de los peces**

Se seleccionan los peces de ensayo de una misma población, y preferentemente de un mismo desove, que se haya mantenido al menos dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad del agua e iluminación similares a las del ensayo. Debe proporcionárseles una ración alimentaria diaria del 2 % de su peso corporal como mínimo y preferiblemente del 4 % mientras duren la preparación y el ensayo.

Transcurridas 48 horas en esas condiciones, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

— si la mortalidad es superior al 10 % de la población en siete días, se rechaza todo el lote,

— si la mortalidad se halla entre el 5 y el 10 % de la población, se prolonga otros siete días el período de aclimatación; si durante este segundo período la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote,

— si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en siete días, se acepta el lote.

Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el ensayo ni en las dos semanas anteriores al mismo.

▼B

1.7. DISEÑO DEL ENSAYO

Se entenderá por «diseño del ensayo» la selección del número de concentraciones de ensayo y el intervalo entre las mismas, el número de recipientes por concentración y el número de peces por recipiente. Lo más idóneo es diseñar el ensayo con arreglo a:

a) el objetivo del estudio;

b) el método de análisis estadístico que vaya a emplearse;

c) la disponibilidad y el coste de los recursos experimentales.

En la medida de lo posible, el enunciado del objetivo debe especificar la potencia estadística necesaria para detectar una diferencia determinada (por ejemplo, de tasa de crecimiento) o la precisión con la que ha de proporcionarse la EC_x (por ejemplo, x — 10, 20 o 30 y preferiblemente no por debajo de 10) para poder hacer una estimación. Sin ello no puede darse una, indicación precisa de la escala del estudio.

Es importante ser consciente de que un diseño idóneo (que saca mayor partido de los recursos) para un método de análisis estadístico no lo es necesariamente para otro. Así pues, el diseño recomendado para la estimación de una LOEC/NOEC no será el mismo que se recomiende para un análisis por regresión.

En la mayoría de los casos, es preferible el análisis de regresión al análisis de la varianza, por los motivos que exponen Stephan y Rogers (9). Sin embargo, si no se encuentra un modelo de regresión adecuado ($r^2 < 0{,}9$), debe recurrirse a la NOEC/LOEC.

1.7.1. **Diseño para el análisis por regresión**

Los aspectos importantes para el diseño de un ensayo que vaya a analizarse por regresión son los siguientes:

a) Es conveniente que las concentraciones empleadas incluyan la concentración con efecto ($EC_{1O,2O,3O}$, etc.) y la gama de concentraciones en la sustancia de ensayo. La precisión con la que puede estimarse la concentración con efecto será mayor si dicha concentración se halla en el medio de la gama de concentraciones empleada en el ensayo. Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas puede resultar útil un ensayo previo de determinación de gama;

b) para que la modelización estadística sea satisfactoria, el ensayo debe incluir al menos un recipiente de control y otros cinco recipientes con distintas concentraciones. En su caso, si se emplea un agente de disolución, debe realizarse, además de las series tratadas con la sustancia de ensayo, un control con agente de disolución a la concentración de ensayo más elevada (véanse los puntos 1.8.3 y 1.8.4);

c) puede emplearse una serie geométrica o logarítmica apropiada (10) (véase el apéndice 3). Es preferible un espaciamiento logarítmico entre las concentraciones de ensayo;

▼B

d) si se dispone de más de seis recipientes, los que sobrepasen dicha cantidad se emplearán como recipientes en paralelo o se distribuirán en la gama de concentraciones para reducir el espaciamiento entre estas.Ambas opciones son igualmente válidas.

1.7.2. **Diseño para la estimación de la NOEC/LOEC mediante análisis de la varianza (ANOVA)**

Conviene disponer de varios recipientes en paralelo para cada concentración y realizar el análisis estadístico por recipiente (11). Sin recipientes en paralelo no puede tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes además de la que existe entre los peces. No obstante, la experiencia ha puesto de manifiesto (12) que en el caso estudiado la variabilidad entre recipientes era muy escasa en relación con la variabilidad dentro de un mismo recipiente (es decir, entre los peces). Así pues, una opción relativamente aceptable consiste en efectuar el análisis estadístico a escala individual con cada pez.

Normalmente se emplea una serie geométrica de al menos cinco concentraciones de sustancia de ensayo, espaciadas por un factor que no supere 3,2.

Por lo general, si se realizan ensayos con recipientes en paralelo, el número de recipientes de control en paralelo y, por tanto, el número de peces ha de ser el doble del empleado con cada concentración de ensayo, que debe ser constante (13) (14) (15). De no usarse recipientes en paralelo, el número de peces del grupo de control ha de ser igual al empleado en cada concentración de ensayo.

Si el análisis de la varianza (ANOVA) se realiza en los recipientes y no a nivel individual [lo cual requeriría marcar todos los peces o utilizar las tasas de crecimiento pseudoespecífico (véase el punto 2.1.2)], se necesita una cantidad suficiente de recipientes en paralelo para poder determinar la desviación estándar de los recipientes con la misma concentración, lo cual significa que el error del análisis de la varianza tendrá al menos 5 grados de libertad (11). Si solo se emplean recipientes en paralelo para los controles, se corre el riesgo de que la variabilidad del error esté sesgada, pues podría aumentar con el valor medio de la tasa de crecimiento en cuestión. Dado que es probable que la tasa de crecimiento disminuya cuando aumente la concentración, se tendería a sobrestimar la variabilidad.

1.8. PROCEDIMIENTO

1.8.1. **Selección y pesaje de los peces**

Es importante que el peso de los peces varíe lo menos posible al inicio del ensayo. En el apéndice I figuran las gamas de peso apropiadas en cada una de las especies recomendadas para el ensayo. Conviene que, al principio del ensayo, la gama de pesos de todo el lote de peces utilizados se mantenga en un intervalo de ± 10 % de la media aritmética y, en cualquier caso, no supere el 25 %. Se recomienda pesar una submuestra de peces antes del ensayo para calcular el peso medio.

▼B

No se proporciona alimento alguno a los peces durante las 24 horas anteriores al inicio del ensayo. A continuación, se toman los peces al azar. Se emplea un anestésico general [por ejemplo, una solución acuosa de 100 mg/l de metanosulfonato de tricaína (MS 222) neutralizada mediante adición de dos partes de bicarbonato sódico por parte de MS 222] para pesar cada sujeto en húmedo (secado con material absorbente) con la precisión indicada en el apéndice 1. Se apartan los peces cuyo peso se halla en el intervalo deseado y se reparten al azar entre los recipientes de ensayo. Se registra el peso húmedo total de los peces de cada recipiente. Tanto el uso de anestésico como la manipulación (incluido el secado y pesaje) pueden afectar y herir a los peces juveniles, sobre todo si se trata de especies de pequeño tamaño. Por ello, deben manipularse los animales objeto del ensayo con la mayor precaución para evitar cualquier agresión.

Se vuelven a pesar los peces el 28º día de ensayo (véase el punto 1.8.6). No obstante, si se considera necesario ajustar la ración alimentaria, pueden pesarse los peces el 14º día de ensayo (véase el punto 1.8.2.3). Para valorar las variaciones de tamaño de los peces y, de ahí, ajustar la ración alimentaria, también puede emplearse otro método como el fotográfico.

1.8.2. **Condiciones de exposición**

1.8.2.1. *Duración*

La duración del ensayo es > 28 días.

1.8.2.2. *Tasa de carga y densidad de población*

Es importante que la tasa de carga y la densidad sean apropiadas para la especie de ensayo empleada (véase el apéndice 1). La tensión que genera a los peces una densidad de población demasiado elevada produce una disminución de la tasa de crecimiento y posiblemente la enfermedad. Por el contrario, si la densidad es demasiado baja, puede dar lugar a un comportamiento territorial, lo cual también puede afectar al crecimiento. En cualquier caso, la tasa de carga debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60 % del valor de saturación en el aire. Un ensayo interlaboratorios (3) ha puesto de manifiesto que, en el caso de la trucha arco iris, resulta aceptable una tasa de carga de 16 truchas de 3 a 5 g en un volumen de 40 1. Se recomienda una frecuencia de renovación del agua durante el ensayo de 6 l/g de pez/día.

1.8.2.3. *Alimentación*

Debe proporcionarse a los peces una dieta suficiente y adecuada (apéndice 1) para permitir una tasa de crecimiento aceptable, al tiempo que se evita la proliferación bacteriana y la turbidez del agua. En el caso de la trucha arco iris, esas condiciones deberían conseguirse con una ración diaria del 4 % de su peso corporal (3) (16) (17) (18). La ración diaria puede dividirse en dos partes iguales y administrarse en dos veces, con un mínimo de 5 horas de intervalo. La ración es función del peso inicial total de los peces de cada recipiente de ensayo. Si los peces se pesan otra vez el 14º día de ensayo, se vuelve a calcular la ración. La alimentación debe suprimirse durante las 24 horas anteriores al pesaje.

▼B

Todos los días debe limpiarse cuidadosamente por succión el fondo de los recipientes de ensayo para eliminar los alimentos que no se hayan consumido y la materia fecal.

1.8.2.4. *Iluminación y temperatura*

El fotoperíodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (véase el apéndice 1).

1.8.3. **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se necesitan cinco concentraciones de sustancia de ensayo, sea cual sea el diseño del mismo (véase el punto l.7.2). Para seleccionar las concentraciones apropiadas es útil conocer previamente la toxicidad de la sustancia de ensayo (por ejemplo, gracias a un ensayo de toxicidad aguda o un estudio de determinación de gamas). El empleo de menos de cinco concentraciones debe justificarse. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua.

Si se emplea un agente de disolución para facilitar la preparación de la solución madre, su concentración final ha de ser preferiblemente la misma en todos los recipientes de ensayo y no debe superar 0,1 ml/l (véase el punto 1.6.3). No obstante, debe evitarse en la medida de lo posible el empleo de tales agentes.

1.8.4. **Controles**

El número de recipientes de control con agua de dilución dependerá del diseño del ensayo (véanse los puntos 1.7 a 1.7.2). Si se emplea un agente de disolución, se realizará la misma cantidad de controles con agua de dilución que con agente de disolución.

1.8.5. **Frecuencia de los análisis y mediciones**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo deben determinarse periódicamente durante el mismo (véase más adelante).

En los ensayos dinámicos, debe comprobarse periódicamente, a ser posible todos los días, los flujos de diluyente y de solución madre de sustancia tóxica. Dichos flujos no deberían variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Cuando la concentración de la sustancia deba permanecer entre el ± 20 % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80 al 120 %; véanse los puntos 1.6.2 y 1.6.3), se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta al principio del ensayo y, a continuación, una vez por semana. En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal (con arreglo a los datos de estabilidad de la sustancia), es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo, pero según el mismo régimen.

En los ensayos semiestáticos (con renovación) en que la concentración de la sustancia debe permanecer entre el + 20 % de la concentración nominal, se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta en cuanto se preparen y justo antes de renovar el medio al principio del estudio y, a continuación, una vez por semana. En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo según el mismo régimen que el empleado con las sustancias más estables.

▼B

Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia de ensayo en la solución se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la concentración medida al inicio, los resultados pueden fundarse en las concentraciones nominales o en las medidas.

En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo, con un filtro de poros de 0,45 μm) o centrifugar las muestras. Aunque la centrifugación es el método recomendado, si el medio de ensayo no se absorbe en los filtros, también puede emplearse la filtración.

Durante el ensayo debe medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. En los controles y en un uno de los recipientes con la concentración más alta se medirán la dureza total, la alcalinidad y la salinidad, si procede. El oxígeno disuelto y la salinidad, cuando proceda, se medirán como mínimo tres veces: al principio, a la mitad y al final del ensayo. En los ensayos semiestáticos se recomienda medir el oxígeno disuelto más a menudo, preferiblemente antes y después de cada renovación del agua o al menos una vez por semana. El pH ha de medirse al principio y al final de cada período de renovación del agua en los ensayos semiestáticos y al menos una vez por semana en los dinámicos. La dureza y la alcalinidad se medirán una vez en cada ensayo. La temperatura debería someterse a control continuo al menos en un recipiente de ensayo.

1.8.6. **Observaciones**

Peso: al final del ensayo deben pesarse en húmedo (secados con material absorbente) todos los peces vivos, en grupos por recipiente de ensayo o individualmente. Es preferible pesar los animales por recipiente, pues el pesaje individual requiere marcar todos los peces. Si se determina la tasa de crecimiento específico de cada pez (pesaje individual), se optará por una técnica de marcado que no perturbe a los animales (en lugar del criomar-cado puede emplearse, por ejemplo, hilo fino de pescar de colores).

Deben examinarse los peces todos los días durante el ensayo y registrarse toda anomalía externa (hemorragias, despigmentación, etc.) y todo comportamiento anómalo. Se tomará nota de todas las muertes y se retirarán los peces muertos lo antes posible. Estos no se sustituirán, ya que la tasa de carga y la densidad de población son suficientemente elevadas para evitar que la variación del número de peces en un recipiente afecte al crecimiento. Sin embargo, deberá adaptarse la ración alimentaria.

2. RESULTADOS E INFORME

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Es aconsejable que participe un estadístico tanto en el diseño como en el análisis del ensayo, pues el presente método da cabida a variaciones considerables en el procedimiento experimental, por ejemplo, en cuanto al número de recipientes y de concentrationes de ensayo, el número de peces, etc. Debido a las diversas posibilidades en el diseño del ensayo, no se proporcionan aqui directrices concretas sobre los métodos estadísticos.

▼B

No es preciso calcular la tasa de crecimiento en los recipientes de ensayo en los que la mortalidad es superior al 10 %, si bien debe indicarse la tasa de mortalidad a todas las concetraciones de ensayo.

Con independencia del método empleado par analizar los datos, el concepto central es la tasa de crecimiento específico *r* entre el momento t_1 y el momento t_2, que puedo definirse de varias formas según si los peces se han marcado individualmente o no o si se necessita una media por recipiente.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

donde:

r_1 = tasa de crecimiento específico de cada pez,

r_2 = tasa de crecimiento específico medio por recipiente,

r_3 = tasa de crecimiento pseudoespecífico,

w_1, w_2 = peso de un pez determinado en los momentos t_1 y t_2, respectivamente,

$\log_e w_1$ = logaritmo del peso de un pez determinado al inicio del período de estudio,

$\log_e w_2$ = logaritmo del peso de un pez determinado al final del período de estudio,

$\log_e W_1$ = media de los logaritmos de los valores w_1 de los peces del recipiente al inicio del período de estudio,

$\log_e W_2$ = media de los logaritmos de los valores w_2 de los peces del recipiente al final del período de estudio.

t_1, t_2 = tiempo (días) inicial y fin del período de estudio

r_1, r_2, r_3 pueden calcularse para el período comprendido entr el día 0 y el día 28 y, si procede (es decir, si se han realizado mediciones el día 14), para los períodos entre los días 0 y 14, y 14 y 28.

2.1.1. **Análisis de los resultados por regresión (modelización concentración-repuesta)**

Este método de análisis establece una relación matemática adecuada entre la tasa de crecimiento específico y la concentración, lo cual permite calcular la «EC_x», es decir, todo valor de EC necesario. Con este método no es preciso calcular (r_2). Es preferible este ultimo método y, además, resultas más adecuado si se utilizan especies más pequeñas.

Con el fin de estudiar la relación concentratión-respuesta, debe hacerce una representación gráfica de las tasas de crecimiento específico medio por recipiente *(r_2)* en función de la concentración.

▼B

Para expresar la relación entre r_2 y la concentración, debe elegirse un modelo adecuado y justificarse la elección mediante un razonamiento pertinente.

Si el número de peces que sobreviven varía de un recipiente a otro, debe ponderarse el proceso de ajuste del modelo para tener en cuenta el tamaño desigual de los grupos.

El método de ajuste del modelo debe permitir estimar, por ejemplo, la EC_{20} y deducir su dispersión (error típico o intervalo de confianza). El gráfico del modelo ajustado debe figurar junto a los datos para poder valorar la adecuación del ajuste del modelo (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Análisis de los resultados para calcular la LOEC**

Si en el ensayo se han utilizado series en paralelo para todas las concentraciones, la estimación de la LOEC podría basarse en el análisis de la varianza (ANOVA) de la tasa de crecimiento específico medio de cada recipiente (véase el punto 2.1), seguido de un método adecuado [por ejemplo, el de Dunnett o de Williams (13) (14) (15) (22)] para comparar la media r a cada concentración con la media r de los controles con el fin de determinar la concentración mínima a la que dicha diferencia es significativa para p = 0,05. Si las hipótesis necesarias relativas a los métodos paramétricos no se cumplen —distribución no normal (por ejemplo, prueba de Shapiro-Wilk) o varianza heterogénea (prueba de Bartlett)—, deberá estudiarse la posibilidad de transformar los datos para homogeneizar las varianzas antes de efectuar el análisis de la varianza (ANOVA) o el análisis ponderado de la varianza (ANOVA).

Si en el ensayo no se han utilizado series en paralelo para todas las concentraciones, el análisis de la varianza (ANOVA) basado en los recipientes resultará insensible o imposible. En ese caso, puede considerarse aceptable basar el análisis de la varianza (ANOVA) en la tasa de crecimiento pseudoespecífico r_3 de cada pez.

A continuación puede compararse la media r, para cada concentración de ensayo con la media r_3 de los controles, tras lo cual puede determinarse la LOEC como anteriormente. Debe admitirse que este método no tiene cuenta en absoluto la variabilidad entre recipientes, al margen de la imputable a la variabilidad entre los peces. Sin embargo, la experiencia ha puesto de manifiesto (9) que la variabilidad entre recipientes es muy escasa en relación con la variabilidad dentro de un mismo recipiente (es decir, entre los peces). Si el análisis no incluye los datos relativos a cada pez, deberá indicarse el método de identificación de los valores atípicos y justificarse su utilización.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben interpretarse con prudencia si las concentraciones medidas de las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se aproximan a los límites de detección del método de análisis o, en los ensayos semi-estáticos, si la concentración de sustancia de ensayo disminuye entre el momento en que se prepara la solución y el momento previo a la renovación.

2.3. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

▼B

2.3.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

— identificación química, incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia de ensayo, si procede.

2.3.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica,

— cepa, tamaño, proveedor, tratamientos previos, etc.

2.3.3. **Condiciones de ensayo:**

— método empleado (por ejemplo, semiestático/renovación o dinámico, carga, densidad de población, etc.),

— diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes de ensayo, de concentraciones de ensayo y de recipientes en paralelo, número de peces por recipiente),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificarán el agente de disolución empleado y su concentración),

— concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores determinados analíticamente en los recipientes de ensayo, desviaciones estándar de estos, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones de la sustancia de ensayo en disolución verdadera,

— características del agua de dilución: pH, dureza, alcalinidad, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto,

— información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimento o alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

2.3.4. **Resultados:**

— datos que demuestren que los controles cumplen los criterios de validez relativos a la supervivencia y datos de la mortalidad observada en todas las concentraciones de ensayo,

— técnicas de análisis estadístico aplicadas, estadísticas basadas en las series en paralelo o en los peces, tratamiento de los datos y justificación de los métodos empleados,

— cuadros que recojan el peso individual y medio de los peces los días 0, 14 (si se han pesado) y 28, valores de las medias por recipiente o tasas de crecimiento pseudoespecífico (si procede) correspondientes a los períodos de 0 a 28 días o, en su caso, de 0 a 14 y de 14 a 28,

— resultados del análisis estadístico [análisis de regresión o análisis de la varianza (ANOVA)], preferiblemente nen forma de cuadro y de gráfico. LOEC ($p = 0,05$) y NOEC o EC con sus errores típicos, si es posible.

▼B

— incidencia de toda reacción anómala de los peces y de todo efecto visible producido por la sustancia de ensayo.

3. REFERENCIAS

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 93 50 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C.H. y Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio reno),* a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method, Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236

(3) Ashley S., Mallett M.J. y Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M. Crossland N.O. (1985). A method to evalúate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(4) Crossland N.O. (1985). A method to evalúate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M, Munk R., Scholz N. y Hófte B.B. (1991). Effect of 3.4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety. 21. pp 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio. Japón.

(7) Holcombe . G.W.. Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. y Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Environ. Coma. Toxicol. 28, pp 287-297.

(8) Benoit, D.A., Holcombe, GAV. y Spehar, R.L. (199l). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600:3-91-06 3. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth. Minesota.

(9) Stephan CE. y Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner y D J Hansen. Eds. American Society for Testing and Materials, Filadelfia, pp 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 p.

(11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham. UK, 10-12 diciembre de 1991.

(13) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.

(15) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(16) Johnston, W.L., Atkinson. J.L., Glanville NT. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-13 3.

(17) Quinton, J. C. y Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and radon level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynhus* mykiss. Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City. Nueva Jersey, E.E.U.U. 288 P.

(19) Bruce, R.D. y Vorsteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. y Mclntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estímate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.

Apéndice 1

ESPECIES DE PECES RECOMENDADAS Y CONDICIONES ADECUADAS PARA EL ENSAYO

Especie	Gama de temperatura recomendada (ºC)	Fotoperíodo (horas)	Gama recomendada de peso inicial de los peces (g)	Precisión exigida de la medición	Tasa de carga (g/l)	Densidad de población (por litro)	Alimentación	Duración del ensayo (días)
Especie recomendada:								
Oncorhynchus mykiss Trucha arco iris	12,5 - 16,0	12-16	1-5	100 mg	1,2 - 2,0	4	Especialidad alimentaria seca para crías de salmónidos	> 28
Otras especies bien documentadas:								
Danio rerio Pez cebra	21-25	12-16	0,050 - 0,100	1 mg	0,2 - 1,0	5-10	Alimento vivo *(Brachionus artemia)*	> 28
Oryzias latipes Medaka	21-25	12-16	0,050 - 0,100	To nearest 1 mg	0,2 - 1,0	5-20	Alimento vivo *(Brachionus artemia)*	> 28

▼B

Apéndice 2

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE

Sustancia	Concentraciones
Materia en suspensión	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoniaco no ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

▼B

Apéndice 3

Series logarítmicas de concentraciones válidas para un ensayo de toxicidad (10)

Columna (Número de concentraciones entre 100 y 10, o entre 10 y 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Puede seleccionarse una serie de 5 (o más) concentraciones sucesivas en una columna. Los puntos medios entre las concentraciones de la columna (x) se encuentran en la columna (2x + 1)l Los valores recogidos pueden representar concentraciones expresadas como porcentaje en volumen o en peso (mg/l o µg/l). Los valores pueden multiplicarse o dividirse por la potencia de 10 adecuada. Puede emplearse la primera columna si el grado de toxicidad es muy incierto.

▼B

C.15. ENSAYO DE TOXICIDAD A CORTO PLAZO EN *EMBRIONES* DE PEZ Y ALEVINES

1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad a corto plazo reproduce las directrices del documento OCDE TG 212 (1998).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines abarca la exposición del animal desde la fase de huevo recién fecundado hasta el final de la fase de alevín. No se proporciona alimento alguno a embriones y alevines durante el ensayo, que debe, por tanto, concluir cuando los alevines sigan nutriéndose de la vesícula vitelina.

El presente ensayo tiene por objeto determinar los efectos letales y, en menor medida, subletales de sustancias químicas en fases concretas de la vida de las especies sometidas al mismo. Proporciona información útil, pues puede: a) constituir un nexo entre los ensayos letales y subletales; b) servir de ensayo de detección de cara a un ensayo completo en las primeras fases de la vida o a los ensayos de toxicidad crónica, y c) emplearse para estudiar especies en relación con las cuales las técnicas de cría no estén suficientemente avanzadas para abarcar el período de transición de la alimentación endógena a la exógena.

Cabe señalar que los ensayos que abarcan todas las fases de la vida de los peces son los únicos que suelen permitir una estimación precisa de la toxicidad crónica de las sustancias químicas en estos animales y que, si se limita la exposición de manera que no cubra una u otra fase de la vida, puede perderse sensibilidad y, por tanto, subestimarse la toxicidad crónica. Por consiguiente, el ensayo en embriones y alevines resultará menos sensible que un ensayo completo en las primeras fases de la vida, sobre todo si se trata de sustancias muy lipó-filas (log P_{ow} > 4) o sustancias que posean una forma de actuación tóxica particular. Cabe esperar, no obstante, que la diferencia de sensibilidad entre los dos ensayos sea menor con las sustancias de acción narcótica no específica (1).

Hasta la publicación del presente ensayo, el ensayo con embriones y alevines se ha llevado a cabo principalmente con el pez de agua dulce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (teleósteos, ciprínidos, nombre común: pez cebra); de ahí que en el apéndice 1 figuren indicaciones detalladas para la realización del mismo con esa especie, si bien pueden emplearse otras con las que se disponga de experiencia (cuadros 1A y 1B).

1.2. DEFINICIONES

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): concentración más baja de sustancia de ensayo con la que se observa un efecto significativo (para $p < 0,05$) en comparación con el control. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de provocar un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración.

Concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC): concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC.

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Se exponen los embriones de pez y los alevines a una gama de concentraciones de la sustancia de ensayo disuelta en agua. El protocolo permite elegir entre un procedimiento semiestático o dinámico, según la naturaleza de la sustancia de ensayo. El ensayo comienza cuando se colocan los huevos fecundados en los recipientes de ensayo y finaliza justo antes de que la vesícula vitelina de cualquiera de las larvas de cualquiera de los recipientes sea reabsorbida por completo o antes de que los animales del lote de control empiecen a morir de inanición. Los efectos letales y subletales se evalúan y comparan con los valores del control con el fin de determinar la concentración mínima con efecto observado y, de ahí, la concentración máxima sin efecto observado. Los efectos también pueden analizarse mediante un modelo de regresión a fin de calcular la concentración que provocaría un porcentaje de efecto determinado (CL/EC_X, donde x es un porcentaje de efecto definido).

1.4. INFORMACIÓN RELATIVA A LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Debe disponerse de los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el método C.1) efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo, ya que pueden resultar útiles para seleccionar una gama apropiada de concentraciones para el ensayo en las primeras fases de la vida. Debe conocerse la solubilidad en el agua (incluida la solubilidad en el agua del ensayo) y la presión de vapor de la sustancia de ensayo. Para calcular la cantidad de sustancia en las soluciones de ensayo debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo límite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe.

La información útil para establecer las condiciones de ensayo incluye la fórmula estructural de la sustancia de ensayo, su pureza, estabilidad a la luz, estabilidad en las condiciones de ensayo, pKa, P_{ow} y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la tasa global de supervivencia de los huevos fecundados en los lotes de control y, en su caso, en los recipientes que solo contengan disolvente ha de ser superior o igual a los límites establecidos en los apéndices 2 y 3,

— la concentración de oxígeno disuelto ha de situarse entre el 60 y el 100 % del valor de saturación en el aire a lo largo del ensayo,

— en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 ºC entre los recipientes de ensayo ni entre dos días sucesivos y debe mantenerse en las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (apéndices 2 y 3).

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Recipientes de ensayo**

Puede emplearse cualquier recipiente de cristal u otro material inerte químicamente, de dimensiones suficientes para que se cumplan los criterios de carga (véase el punto 1.7.1.2). Se recomienda colocar los recipientes al azar en la zona donde se lleve a cabo el ensayo. Si en el laboratorio hay efectos sistemáticos que pueden paliarse mediante el agrupamiento, es preferible colocar los recipientes según un esquema de agrupamiento aleatorizado (velando por que todos los tratamientos se apliquen en todos los grupos) que según un esquema completamente aleatorizado. En caso de que se agrupen los recipientes, debe tenerse presente en el análisis posterior de los datos. Los recipientes de ensayo han de protegerse de toda perturbación indeseada.

1.6.2. **Selección de la especie de peces**

Las especies de peces recomendadas figuran en el cuadro 1A, aunque es posible emplear otras (cuadro 1B), si bien entonces puede ser necesario adaptar el procedimiento para que las condiciones de ensayo sean adecuadas. En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

1.6.3. **Manipulación de los peces reproductores**

Las directrices de ensayo 210 de la OCDE ([1]) y las referencias (2) (3) (4) (5) (6) de la bibliografía recogen indicaciones detalladas sobre la manipulación de peces reproductores en condiciones satisfactorias.

1.6.4. **Manipulación de los embriones y las larvas**

Los embriones y las larvas pueden colocarse en receptáculos provistos de paredes o extremos de malla dentro del recipiente principal para permitir el flujo de la solución de ensayo. Puede provocarse un flujo no turbulento a través de los pequeños receptáculos suspendiéndolos de un brazo que los desplace en sentido vertical, pero de manera que los organismos permanezcan siempre sumergidos. Puede emplearse, asimismo, un sistema de sifón. Los huevos fecundados de salmónidos pueden depositarse en rejillas o mallas con aperturas de dimensiones suficientes para que las larvas pasen a través después de la eclosión. En los ensayos semiestáticos con renovación diaria y completa del medio, conviene utilizar pipetas Pasteur para la toma de embriones y larvas (véase el punto 1.6.6).

Si se utilizan cubetas, rejillas o mallas para mantener los huevos en el recipiente principal de ensayo, deben retirarse después de la eclosión de las larvas ([1]), pero deben conservarse las mallas que impidan que los peces se escapen. Si es necesario trasladar las larvas, no deben exponerse al aire ni emplearse redes para sacar a los peces de los recipientes que contengan los huevos (con algunas especies menos frágiles, como la carpa, estas precauciones pueden resultar superfluas). El momento de dicho traslado varía según la especie y no siempre es necesario. En los ensayos semiestáticos, pueden emplearse vasos de laboratorio o recipientes poco profundos y provistos, en su caso, de una rejilla a escasa distancia del fondo. Si el volumen de esos recipientes es suficiente para que se cumplan los requisitos de carga (véase el punto 1.7.1.2), no es preciso trasladar los embriones o larvas.

([1]) OECD, París. 1992. Directrices de ensayo 210. «Ensayo de toxicidad en las primeras fases de la vida en peces».

▼B

1.6.5. **Agua**

Puede utilizarse para el ensayo toda agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable enumeradas en el apéndice 4 y en la que la especie sometida a ensayo muestre una tasa de supervivencia en el lote de control al menos igual que la recogida en los apéndices 2 y 3. Su calidad ha de ser constante a todo lo largo del ensayo. La variación del pH debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 unidades. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo) ni altera el comportamiento de los peces reproductores. Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada 3 meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl y SO_4), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada 6 meses).

1.6.6. **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de la solución madre.

La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia de ensayo en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) para lograr la concentración adecuada de solución madre. Debe evitarse, en la medida de lo posible, el uso de disolventes o dispersantes (agentes de disolución); sin embargo, en algunos casos pueden ser necesarios para obtener una solución madre a la concentración deseada. Puede entonces utilizarse como disolvente acetona, etanol, metanol, dimetilformamida o trietilenglicol, y como dispersante Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % o HCO-40. Deben tomarse precauciones si se emplean agentes fácilmente biodegradables (como la acetona) y/o muy volátiles, pues estos pueden dar lugar a una proliferación bacteriana en los ensayos dinámicos. Si se emplea un agente de disolución, no debe actuar de forma significativa sobre la supervivencia ni producir efectos nocivos visibles en las primeras fases de la vida, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo contenga disolvente. No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

En el caso de los ensayos semiestáticos, pueden aplicarse dos métodos distintos de renovación: o bien se preparan sustancias de ensayo nuevas en recipientes limpios y se transfieren cuidadosamente los huevos y larvas supervivientes en un pequeño volumen de la solución antigua, evitando exponerlos al aire, o bien se dejan los organismos sometidos a ensayo en su recipiente y se cambian al menos las tres cuartas partes del agua de ensayo. La frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad de la sustancia de ensayo, si bien se recomienda renovarlo todos los días. Si los ensayos preliminares de estabilidad (véase el punto 1.4) ponen de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, queda fuera del intervalo del 80 al 120 % de la concentración nominal o cae por debajo del 80 % de la concentración medida al inicio) entre dos renovaciones, debe plantearse la realización de un ensayo dinámico. En cualquier caso, debe velarse por evitar toda agresión a las larvas durante la renovación del agua.

▼B

Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no debería variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Se considera adecuado un régimen de flujo equivalente al menos a 5 veces el volumen del recipiente de ensayo cada 24 horas (2).

1.7. PROCEDIMIENTO

Se ha publicado información útil sobre la realización de los ensayos de toxicidad en embriones de pez y alevines. La bibliografía del presente texto recoge algunos ejemplos (7) (8) (9) de tales publicaciones.

1.7.1. **Condiciones de exposición**

1.7.1.1. *Duración*

Conviene iniciar el ensayo en los 30 minutos siguientes a la fecundación de los huevos. Los embriones se sumergen en la solución de ensayo antes o después (pero lo antes posible) de que comience la fase de división del blastodisco y, en cualquier caso, antes de que empiece la fase de gástrula. Si los huevos proceden de un proveedor comercial, puede resultar imposible iniciar el ensayo inmediatamente después de la fecundación. Dado que un retraso en el inicio del ensayo puede afectar seriamente a la sensibilidad del mismo, debería iniciarse en las 8 horas siguientes a la fecundación. Puesto que no se proporciona alimento a las larvas durante el período de exposición, el ensayo debe finalizar justo antes de que se haya reabsorbido por completo la vesícula vitelina de una cualquiera de las larvas de cualquiera de los recipientes de ensayo o antes de que haya muertes por inanición en los lotes de control. La duración del ensayo dependerá de la especie utilizada. Los apéndices 2 y 3 recogen recomendaciones al respecto.

1.7.1.2. *Carga*

El número de huevos fecundados al principio del ensayo ha de ser suficiente para responder a las necesidades estadísticas. Se reparten al azar entre los distintos tratamientos y se coloca un mínimo de 30 huevos fecundados, repartidos equitativamente (o lo más equitativamente posible, ya que con algunas especies es difícil obtener lotes iguales) entre, al menos, tres recipientes de ensayo en paralelo por cada concentración. La tasa de carga (biomasa por volumen de ensayo de solución) debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60 % del valor de saturación en el aire. En los ensayos dinámicos, se recomienda una tasa de carga que no supere 0,5 g/l en 24 horas ni 5 g/l de solución en cualquier momento (2).

1.7.1.3. *Iluminación y temperatura*

El fotoperíodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (apéndices 2 y 3). Para vigilar la temperatura puede ser conveniente emplear un recipiente de ensayo adicional.

▼B

1.7.2. **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se necesitan 5 concentraciones de sustancia de ensayo espaciadas por un factor constante que no supere 3.2. Para seleccionar la gama de concentraciones de ensayo debe tenerse presente la curva CL_{50}/período de exposición del estudio de toxicidad aguda. En algunos casos puede estar indicado utilizar menos de 5 concentraciones, por ejemplo, en los ensayos límite, y un intervalo más pequeño entre concentraciones. El empleo de menos de 5 concentraciones debe justificarse. No es preciso someter a ensayo concentraciones superiores a la CL_{50} tras 96 horas, o a 100 mg/l, si esta concentración es inferior a dicha CL_{50}. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua de ensayo.

Si se emplea un agente de disolución para facilitar la preparación de las soluciones de ensayo (véase el punto 1.6.6), su concentración final ha de ser la misma en todos los recipientes de ensayo y no debe superar 0,1 ml/l.

1.7.3. **Controles**

Paralelamente a las series tratadas con la sustancia de ensayo, debe hacerse un lote de control con agua de dilución (en tantos ejemplares como sea necesario) y, si procede, otro control con agente de disolución (en tantos ejemplares como sea necesario).

1.7.4. **Frecuencia de los análisis y medidas**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo deben determinarse periódicamente durante el mismo.

En los ensayos semiestáticos en que la concentración de la sustancia debe permanecer entre el ± 20 % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80 al 120 %; véanse los puntos 1.4 y 1.6.6), se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta en cuanto se preparen y justo antes de renovar el medio, al menos en tres ocasiones regularmente espaciadas a lo largo del ensayo (los análisis deben practicarse en muestras de la misma solución, tomadas justo después de su preparación y en el momento de la renovación).

En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal (con arreglo a los datos de estabilidad de la sustancia), es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo cuando se acaben de preparar y en el momento de la renovación, pero según el mismo régimen, es decir, al menos tres veces regularmente espaciadas a lo largo del ensayo. Es suficiente con determinar las concentraciones de la sustancia de ensayo antes de la renovación del medio en un solo recipiente por concentración. Las determinaciones no han de espaciarse más de 7 días. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia de ensayo en la solución se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la concentración medida al inicio, los resultados pueden fundarse en estas.

En los ensayos dinámicos, conviene aplicar un régimen de muestreo similar al descrito para los ensayos semiestáticos (si bien en este caso no cabe hacer determinaciones antes de renovar las soluciones). No obstante, si el ensayo dura más de 7 días, puede ser oportuno incrementar el número de tomas de muestras durante la primera semana (por ejemplo, tres series de medidas) para cerciorarse de que las concentraciones de ensayo permanecen estables.

▼B

En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo, con un filtro de poros de 0,45 μm) o centrifugar las muestras, pero, como ni la filtración ni la centrifugación permiten siempre separar la fracción no biodispo-nible de la sustancia de ensayo de su fracción biodisponible, no es indispensable efectuarlas.

Durante el ensayo debe medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. En los controles y en un uno de los recipientes con la concentración más alta se medirá la dureza total y la salinidad, si procede. El oxígeno disuelto y la salinidad, cuando proceda, se medirán como mínimo tres veces: al principio, a la mitad y al final del ensayo. En los ensayos semiestáticos se recomienda medir el oxígeno disuelto más a menudo, preferiblemente antes y después de cada renovación del agua o al menos una vez por semana. El pH ha de medirse al principio y al final de cada período de renovación del agua en los ensayos semiestáticos y al menos una vez por semana en los dinámicos. La dureza se medirá una vez en cada ensayo. La temperatura debería medirse todos los días y lo ideal sería un control continuo al menos en un recipiente de ensayo.

1.7.5. **Observaciones**

1.7.5.1. *Fase de desarrollo embrionario*

Al principio de la exposición a la sustancia de ensayo debe comprobarse con tanta precisión como sea posible la fase embrionaria (gástrula) en una muestra representativa de huevos debidamente conservados y limpiados. Puede asimismo consultarse la bibliografía, que recoge descripciones e ilustraciones de las fases embrionarias (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Eclosión y supervivencia*

Al menos una vez al día deben observarse y contarse las eclosiones y los supervivientes. Puede ser conveniente efectuar observaciones más frecuentes al principio del ensayo (por ejemplo, cada 30 minutos durante las tres primeras horas), pues en algunos casos el tiempo de supervivencia puede ser más significativo que solo el número de muertes (por ejemplo, si se producen efectos tóxicos agudos). Las larvas y embriones muertos deben retirarse en cuanto se localicen, ya que pueden descomponerse rápidamente. Dicha retirada ha de hacerse con sumo cuidado para no tocar ni dañar físicamente los huevos y larvas adyacentes, pues son extremadamente delicados y sensibles. Los criterios para considerar que un organismo está muerto varían según la fase del desarrollo:

— **huevos:** sobre todo en la fase más temprana, disminución acusada de translucidez y cambio de la coloración debido a la coagulación y/o precipitación de proteínas, que les dan un aspecto blanco opaco,

— **embriones:** ausencia de movimientos corporales y/o ausencia de latido cardíaco y/o decoloración opaca en las especies cuyos embriones son translúcidos normalmente,

— **larvas:** inmovilidad y/o ausencia de movimiento respiratorio y/o ausencia de latido cardíaco y/o coloración blanca opaca del sistema nervioso central y/o ausencia de reacción a los estímulos mecánicos.

▼B

1.7.5.3. *Aspecto anómalo*

El número de larvas que presenten anomalías corporales y/o pigmentarias, así como la fase de reabsorción de la vesícula vitelina deben registrarse a intervalos adecuados con arreglo a la duración del ensayo y la naturaleza de la anomalía observada. Cabe señalar que la aparición de larvas y embriones anómalos ocurre en condiciones normales y que su proporción puede alcanzar varias unidades por cada 100 en los controles de algunas especies. Los animales que presenten anomalías solo deben retirarse de los recipientes de ensayo cuando estén muertos.

1.7.5.4. *Comportamiento anómalo*

Las anomalías como la hiperventilación, natación descoordinada o inactividad atípica deben registrarse a intervalos adecuados según la duración del ensayo. Pese a ser difíciles de cuantificar, estos efectos pueden contribuir a interpretar los datos de mortalidad proporcionando información sobre el modo de actuación tóxica de la sustancia.

1.7.5.5. *Longitud*

Se recomienda medir la longitud de cada sujeto al final del ensayo utilizando la longitud estándar, la longitud a la horquilla o la longitud total. Si se observa una descomposición de la aleta caudal o un desgaste de las aletas, debe emplearse la longitud estándar. Por lo general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación de la longitud entre los distintos recipientes de los controles ha de ser 20 %.

1.7.5.6. *Peso*

Puede pesarse cada sujeto al final del ensayo; el peso seco (24 horas a 60 ºC) es preferible al peso húmedo (secados con material absorbente). Por lo general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación del peso entre los distintos recipientes de los controles ha de ser ≤ 20 %.

Gracias a las observaciones anteriores, se obtienen algunos o todos los datos siguientes para el análisis estadístico:

— mortalidad acumulativa,

— número de larvas sanas al final del ensayo,

— momento en que empieza y acaba la eclosión (90 % de eclosiones en cada recipiente en paralelo),

— número de larvas que eclosionan cada día,

— longitud (y peso) de los animales supervivientes al final del ensayo,

— número de larvas con deformidades o aspecto anómalo,

— número de larvas que presenten un comportamiento anómalo.

▼B

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Es aconsejable que participe un estadístico tanto en el diseño como en el análisis del ensayo, pues el presente método da cabida a variaciones considerables en el procedimiento experimental, por ejemplo, en cuanto al número de recipientes y de concentraciones de ensayo, al número inicial de huevos fecundados y a los parámetros medidos. Debido a las diversas posibilidades en el diseño del ensayo, no se proporcionan aquí directrices concretas sobre los métodos estadísticos.

Si tienen que calcularse la LOEC y la NOEC, será preciso analizar las variaciones en cada serie en paralelo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o las tablas de contingencia. El método de Dunnett puede resultar útil para realizar comparaciones múltiples entre los resultados obtenidos con cada concentración y los de los controles (12) (13). Las referencias (14) y (15) de la bibliografía recogen otros ejemplos útiles. Debe calcularse y registrarse la magnitud del efecto detectable mediante el análisis de la varianza (ANOVA) u otros métodos (es decir, la potencia del ensayo). Cabe señalar que no todas las observaciones relacionadas en el punto 1.7.5.6 se prestan al tratamiento estadístico por análisis de la varianza (ANOVA). Así, por ejemplo, la mortalidad acumulativa y el número de larvas sanas al final del ensayo pueden analizarse por métodos de probita.

Si procede calcular la CL y la EC_X, una o varias curvas adecuadas, como puede ser la curva logística, deben ajustarse a los resultados pertinentes mediante un método estadístico como el de los mínimos cuadrados o los mínimos cuadrados no lineales. Las curvas deben parametrarse de manera que puedan estimarse directamente la CL y la EC_X que interese y su error estándar. Así se facilitará en gran medida el cálculo de los límites de confianza en torno a la CL y la EC_X. Salvo que haya razones de peso para preferir otros niveles de confianza, se seleccionarán límites del 95 % en ambas direcciones. Es preferible que el método de ajuste permita evaluar la significación de la falta de ajuste. Pueden emplearse métodos gráficos para ajustar las curvas. Todas las observaciones enumeradas en el punto 1.7.5.6 se prestan al análisis de regresión.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben interpretarse con prudencia cuando las concentraciones medidas de las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se aproximen a los límites de detección del método de análisis. Asimismo, los resultados relativos a concentraciones superiores a la solubilidad de la sustancia en el agua han de interpretarse con precaución.

2.3. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.3.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

— identificación química, incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia de ensayo, si procede.

▼B

2.3.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica, variedad, número de peces parentales (es decir, número de hembras empleadas para obtener la cantidad de huevos necesarios para el ensayo), fuente y método de recogida de los huevos fecundados y manipulaciones posteriores.

2.3.3. **Condiciones de ensayo:**

— método empleado (por ejemplo, semiestático o dinámico, tiempo transcurrido entre la fecundación y el inicio del ensayo, carga, etc.),

— fotoperíodo(s),

— diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes de ensayo y número de recipientes en paralelo, número de embriones por recipiente en paralelo),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificarán el agente de disolución empleado y su concentración),

— concentraciones nominales de ensayo, valores medidos en los recipientes de ensayo, medias y desviaciones estándar de estos y método de obtención; si la sustancia de ensayo es soluble en el agua a concentraciones inferiores a las de ensayo, debe demostrarse que las mediciones se refieren a las concentraciones de la sustancia de ensayo en disolución,

— características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

2.3.4. **Resultados:**

— resultados de los posibles estudios preliminares relativos a la estabilidad de la sustancia de ensayo,

— datos que demuestren que los controles cumplen la norma general de aceptabilidad en materia de supervivencia de la especie sometida a ensayo (apéndices 2 y 3),

— datos de la mortalidad y la supervivencia en las fases de embrión y de larva y tasas globales de mortalidad y supervivencia,

— días transcurridos hasta la eclosión y número de eclosiones,

— longitud (y peso),

— incidencia y descripción de las anomalías morfológicas, en su caso,

— incidencia y descripción de los efectos sobre el comportamiento, en su caso,

— análisis estadístico y tratamiento de los datos,

— en el caso de los ensayos sometidos al análisis de la varianza, la concentración mínima con efecto observado (LOEC) para $p = 0,05$ y la concentración máxima sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada, así como una descripción de los métodos estadísticos empleados y una indicación de la magnitud del efecto que puede detectarse,

▼B

— en el caso de los ensayos analizados mediante técnicas de regresión, la CL/EC_x, e intervalos de confianza, y un gráfico del modelo ajustado que se haya utilizado para su cálculo,

— justificación de toda desviación respecto al presente método de ensayo.

3. **REFERENCIAS**

(1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp. 60. Junio de 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J.L. y Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W.A. y Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061. Duluth, Minnesota.

(5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.

(6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. *y* Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J.W., Black J.A. y Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determinmg the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. y Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.

(10) Kirchen R.V. y W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R.V. y W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, Carolina del Norte. 36 pp.

(12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.

(14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. y Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Filadelfia.

▼B

(15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. y Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, Diciembre de 1992, pp. 81.

(17) Dave G. y Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury. Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C.H. y Orti G. (199 3). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*). A model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

(19) Ghillebaert F. Chaillou C, Deschamps F. y Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA repon EPA/600/3-91/064, Dic. 1991. EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dic. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G. Dean J.H. y Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells. Oxford. Vol. 1, capítulo 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar y D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Cuadro 1A

Especies de peces recomendadas para el ensayo

Agua dulce
Oncorhynchus mykiss
Trucha arco iris (9) (16)
Danio rerio
Pez cebra (7) (17) (18)
Cyprinus caprio
Carpa común (8) (19)
Oryzias latipes
Medaka (20) (21)
Pimephales promelas
Piscardo (8) (22)

▼B

Cuadro 1B

Ejemplos de otras especies bien documentada que también han sido utilizadas

Agua dulce	Agua salada
Carassius auratus Carpa dorada (8)	*Menidia peninsulae* Pejerrey del Atlántico Occidental (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Pez sol de agallas azules (8)	*Clupea harengus* Arenque (24) (25)
	Gadus morhua Bacalao (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Pelota (23) (24) (25)

▼B

Apéndice 1

DIRECTRICES SOBRE LA REALIZACIÓN DE UN ENSAYO DE TOXICIDAD EN EMBRIONES Y ALEVINES DE PEZ CEBRA *(BRACHYIANIO RERIO)*

INTRODUCCIÓN

El pez cebra es originario de la costa de Coromandel en la India, donde vive en ríos de corriente rápida. Es una especie común de acuario, que pertenece a la familia de las carpas. La información relativa a los métodos de cría y los cuidados que requieren figuran en los manuales de referencia sobre peces tropicales. Laale ha estudiado su biología y su empleo en la investigación relacionada con la pesca (1).

Este pez rara vez supera los 45 mm de longitud. Su cuerpo cilíndrico posee entre 7 y 9 rayas horizontales de color azul oscuro y plateado, que se prolongan hasta las aletas caudal y anal. El dorso es verde aceituna. Los machos son más estrechos que las hembras, y estas son más plateadas y presentan un abdomen más distendido, en particular antes del desove.

Los peces adultos soportan grandes variaciones de temperatura, pH y dureza. Sin embargo, para obtener peces sanos que produzcan huevos de buena calidad debe mantenérselos en condiciones óptimas.

Durante el desove, el macho persigue a la hembra y le da golpes con la cabeza. Los huevos son fecundados apenas expulsados. Los huevos, que son transparentes y no adherentes, caen al fondo, donde pueden ser ingeridos por los padres. La luz influye en el desove. Si la luz de la mañana es suficiente, los peces suelen desovar en las horas siguientes al amanecer.

Una hembra puede realizar desoves de varios centenares de huevos a intervalos de una semana.

ESTADO DE LOS PECES PARENTALES, REPRODUCCIÓN Y PRIMERAS FASES DE LA VIDA

Se selecciona un número adecuado de peces sanos y se mantienen en un agua apropiada (véase el apéndice 4, por ejemplo) al menos durante dos semanas antes de la fecha prevista para el desove. Los peces han de reproducirse al menos una vez antes de producir los huevos que vayan a emplearse en el ensayo. La densidad en este período no debe superar 1 gramo de peces por litro. La renovación regular del agua y la utilización de sistemas de purificación pueden dar lugar a densidades mayores. La temperatura en los acuarios debe mantenerse a 25 ± 2 °C y debe proporcionarse a los peces un régimen alimentario variado, que puede consistir, por ejemplo, en alimentos deshidratados adecuados que se encuentran en el comercio, Artemia vivos recién eclosionados, quironómidos, Daphnia o gusanos blancos (Enquitreidos).

A continuación se recogen dos métodos con los que se han obtenido en la práctica camadas suficientes de huevos fecundados sanos de cara a la realización de un ensayo:

i) se colocan 8 hembras y 16 machos en un acuario con 50 litros de agua de dilución y protegido de la luz directa. Debe evitarse en la mayor medida posible perturbarlos al menos durante 48 horas. En la tarde del día anterior al inicio del ensayo se coloca en el fondo del acuario un soporte para el desove, formado por un bastidor (de plexiglás u otro material adecuado) de 5 a 7 cm de alto, con una red de malla gruesa (2-5 mm) en la parte superior y una red de malla fina (10-30 μm) en la parte inferior. Se atan a la malla gruesa del soporte varios «árboles de desove», consistentes en una cuerda de nailon sin retorcer. Se deja a los peces 12 horas en la oscuridad y, a continuación, se enciende una luz tenue para que empiece el desove. Entre 2 y 4 horas después de este, se retira el soporte y se recogen los huevos. El soporte impide que los peces ingieran los huevos, al tiempo que facilita la recogida de estos. Los peces deben haber desovado al menos una vez antes de recoger los huevos que vayan a emplearse en el ensayo;

▼B

ii) se mantienen de 5 a 10 peces machos y hembras en acuarios individuales durante un mínimo de 2 semanas antes de la fecha prevista para el desove. Entre 5 y 10 días después, el abdomen de las hembras se distiende y sus papilas genitales se hacen visibles. Los machos no tienen papilas. El desove se lleva a cabo en recipientes provistos de un falso fondo de malla (véase más arriba). El recipiente se llena con agua de dilución hasta una altura de 5 a 10 cm por encima de la malla. Se colocan una hembra y dos machos en el recipiente la víspera de la fecha prevista para el desove. Se aumenta progresivamente la temperatura del agua hasta un grado por encima de la temperatura de aclimatación. Se apaga la luz y se evita en la mayor medida posible toda perturbación de los peces. Por la mañana, se enciende una luz tenue para que empiece el desove. Entre 2 y 4 horas más tarde, se retiran los peces y se recogen los huevos. Si se necesitan más huevos de los que puede poner una hembra, pueden disponerse en paralelo los acuarios que sean necesarios. Si se registra la capacidad de reproducción de cada hembra antes del ensayo (volumen de la camada y calidad de los huevos), podrán seleccionarse para este las que tengan mayor capacidad reproductora.

Los huevos se trasladan a los recipientes de ensayo en tubos de vidrio, de diámetro interno superior o igual a 4 mm y provistos de una pera de succión. El trasvase de huevos debe realizarse con la menor cantidad de agua posible. Los huevos pesan más que el agua y caen fuera del tubo. Debe evitarse que los huevos (y las larvas) estén en contacto con el aire. Se practica un examen microscópico de una o varias muestras del lote o lotes para cerciorarse de que no hay anomalías en las primeras fases del desarrollo. No está permitido desinfectar los huevos.

La tasa de mortalidad de los huevos más elevada se da durante las 24 horas siguientes a la fecundación. A menudo se observa durante ese período una tasa de mortalidad del 5 al 40 %. La degeneración de los huevos se debe a una fertilización fallida o a problemas en el desarrollo. Al parecer, la calidad de los huevos depende de la hembra, ya que algunas producen siempre huevos de buena calidad, mientras que otras no lo consiguen nunca. Además, el ritmo de desarrollo y de eclosión varía de una camada a otra. La tasa de supervivencia de los huevos correctamente fecundados y de las larvas suele ser elevada, por lo general superior al 90 %. A 25 ºC, los huevos eclosionan entre 3 y 5 días después de la fecundación y la vesícula vitelina se reabsorbe unos 13 días después de esta.

Hisaoka y Battle han estudiado a fondo el desarrollo embrionario (2). La transparencia de los huevos y de las larvas eclosionadas permite seguir el desarrollo de los peces y detectar la presencia de malformaciones. Unas 4 horas después del desove ya pueden distinguirse los huevos fecundados de los no fecundados (3). Para ello, se colocan los huevos y las larvas en recipientes de ensayo pequeños y se estudian al microscopio.

Las condiciones de ensayo aplicables a las primeras fases de la vida figuran en el apéndice 2. Los valores óptimos de pH y dureza del agua de dilución son de 7,8 y de 250 mg $CaCO_3$/l, respectivamente.

CÁLCULOS Y ESTADÍSTICAS

Se propone un procedimiento en dos etapas. En primer lugar, se hace un análisis estadístico de los datos relativos a la mortalidad, las anomalías en el desarrollo y el momento de la eclosión. A continuación, se hace una evaluación estadística de la longitud corporal de los peces con las concentraciones a las que no se haya observado ningún efecto adverso sobre esos tres parámetros. Se recomienda proceder así porque las sustancias tóxicas pueden matar selectivamente a los peces más pequeños, retrasar el momento de la eclosión e inducir malformaciones macroscópicas, lo cual puede sesgar las mediciones de longitud. Además de ello, la cantidad de peces por medir con cada tratamiento será más o menos la misma, lo cual garantiza la validez del análisis estadístico del ensayo.

▼B

DETERMINACIÓN DE LA CL_{50} Y LA EC_{50}

Se calcula el porcentaje de huevos y larvas supervivientes y se corrige en función de la mortalidad en los controles mediante la fórmula de Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100 \right)$$

donde:

P = porcentaje de supervivientes corregido,

P' = porcentaje de supervivientes observado en la concentración de ensayo,

C = porcentaje de supervivientes en los controles.

Si es posible, la Cl_{50} se determina por un método apropiado al final del ensayo. Si se desea incluir las anomalías morfológicas en el tratamiento estadístico de la EC_{50} pueden encontrarse indicaciones al respecto en el artículo de Stephan (5).

ESTIMACIÓN DE LA LOEC Y LA NOEC

Uno de los objetivos del ensayo con huevos y alevines es comparar los lotes sometidos a concentraciones positivas con los controles para determinar la LOEC, para lo cual habrá que emplear métodos de comparaciones múltiples (6) (7) (8) (9) (10).

REFERENCIAS

(l) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachyianio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121-173.

(2) Hisaoka K.K. y Battle H.L. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brazhydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) I. Morph., 102, pp. 311.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology. 2. pp. 173-181.

(4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3ª ed., Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp. 1-333.

(5) Stephan CE. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster y W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096-1121.

(7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R.R. y Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principies and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

Apéndice 2

CONDICIONES Y DURACIÓN DEL ENSAYO Y CRITERIOS DE SUPERVIVENCIA PARA LAS ESPECIES RECOMENDADAS

Especie	Temperaturea (ºC)	Salinidad (0/00)	Fotoperíodo (horas)	Duración de las fases (días)		Duración habitual del ensayo	Supervivencia en los controles (% mínimo)	
				Embrión	Alevín		Tasa de eclosiones satisfactorias	Tras la eclosión
Agua dulce								
Brachydanio rerio Pez cebra	25 ±1	—	12-16	3-5	8-10	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (8-10 días)	80	90
Onicorhynchus mykiss Trucha arco iris	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30-35	25-30	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 20 días después de la eclosión (50-55 días)	66	70
Cyprinus carpio Carpa común	21-25	—	12-16	5	> 4	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (8-9 días)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (13-16 días)	80	80
Pimephales promelas Piscardo	25 ± 2	—	16	4-5	5	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (8-9 días)	60	70

(1) Para los embriones.
(2) Para las larvas.
(a) Embriones y larvas en la oscuridad hasta una semana después de la eclosión, salvo durante las observaciones. Después, luz tenue hasta el final del ensayo.

Apéndice 3

Condiciones y duración del ensayo y criterios de supervivencia para otras especies bien documentadas

Especie	Temperatura (ºC)	Salinidat(0/00)	Fotoperíodo(horas)	Duración de las fases (días)		Duración habitual del ensayo con embriones y alevines	Supervivencia en los controles (% minimo)	
				Embriones	Alevín		Tasa de eclosiones satisfactorias	Tras la eclosión
AGUA DULCE								
Carassius auratus Carpa dorada	24 ± 1	—	—	3 — 4	> 4	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (7 días)	—	80
Leopomis macrochirus Pez sol do agallas azules	21 ± 1	—	16	3	> 4	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (7 días)	—	75
AGUA SALADA								
Menidia peninsulae Pejerrey del Atlántico Occidental	22-25	15-22	12	1,5	10	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (6-7 días)	80	60
Clupea harengus Arenque	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 3 días después de la eclosión (23-27 días)	60	80
Gadus morhua Bacalao	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 3 días después de la eclosión (18 días)	60	80
Cyprinodon variegatus Petota	25 ± 1	15-30	12	—	—	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4-7 días después de la eclosión (28 días)	> 75	80

▼B

APÉNDICE 4

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE

Sustancia	Concentraciones
Materia en partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoniaco no ionizado	< 1 μg/l
Cloro residual	< 10 μg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

▼B

C.16. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL AGUDA EN ABEJAS

1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad aguda reproduce las directrices del documento OCDE TG 213 (1998).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad consiste en un método de laboratorio diseñado para determinar la toxicidad oral aguda de los productos fitosanitanos y otros productos químicos en abejas obreras adultas.

Para determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser preciso estudiar la toxicidad oral aguda en abejas, por ejemplo, cuando es probable que estas queden expuestas a un producto químico determinado. El ensayo de toxicidad oral aguda se realiza para determinar la toxicidad inherente de los plaguicidas y otras sustancias para las abejas. Sus resultados se emplean para saber si es necesario profundizar en la evaluación. En particular, el método puede emplearse en programas de evaluación del peligro de los plaguicidas para las abejas, basados en una progresión secuencial desde los ensayos de toxicidad en laboratorio hasta los experimentos de semicampo y de campo (1). Los plaguicidas pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados.

Debe emplearse un tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de las abejas y la precisión del procedimiento de ensayo.

1.2. DEFINICIONES

Toxicidad oral aguda: efectos nocivos que se manifiestan durante un período máximo de 96 horas tras la administración oral de una dosis única de la sustancia de ensayo.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo consumida. Se expresa en peso de la sustancia por animal de ensayo (μg/abeja). Dado que la alimentación es colectiva, no puede calcularse la dosis real por abeja, pero puede hacerse una estimación de la dosis media (sustancia de ensayo consumida en su totalidad/número de abejas en una jaula).

DL_{50} (dosis letal media) oral: dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia que puede provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. La DL_{50} se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja. En el caso de los plaguicidas, la sustancia de ensayo puede ser un principio activo (p.a.) o un producto formulado que contenga uno o varios principios activos.

Mortalidad: número de animales muertos, es decir, completamente inmóviles.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se expone a las abejas obreras adultas *(Apis mellifera)* a una gama de dosis de la sustancia de ensayo dispersada en una solución de sacarosa. A continuación, se alimenta a las abejas de la misma forma, pero sin sustancia de ensayo. Se registra la mortalidad todos los días, al menos durante 48 horas, y se compara con las cifras del control. Si la tasa de mortalidad aumenta entre las 24 y las 48 horas y la mortalidad del control permanece a un nivel aceptable, es decir, $\leq$ 10 %, está indicado prolongar el ensayo hasta un máximo de 96 horas. Se analizan los resultados para calcular la DL_{50} a las 24 y a las 48 horas y, en caso de que se haya prolongado el estudio, a las 72 y a las 96 horas.

▼B

1.4. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

— la mortalidad media del total de los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo,

— la DL_{50} del tóxico de referencia debe ajustarse a la gama especificada.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Recolección de las abejas**

Deben emplearse ejemplares adultos jóvenes de abejas obreras de la misma raza, edad, alimentación, etc. Las abejas han de proceder de colonias sanas y bien alimentadas, a ser posible sin enfermedades y con reina, y con antecedentes y estado fisiológico conocidos. Pueden recolectarse la mañana del día en que vaya a realizarse el ensayo, o la víspera por la tarde y mantenerse en condiciones de ensayo hasta el día siguiente. Pueden emplearse abejas procedentes de cuadros sin cría, pero debe evitarse la recolección a principios de la primavera o a finales del otoño, pues en esas épocas las abejas modifican su fisiología. Si es preciso realizar el ensayo en esas épocas, las abejas pueden colocarse en una incubadora y criarse durante una semana con pan de abejas (polen tomado del panal) y solución de sacarosa. Si se utilizan abejas tratadas con productos químicos como antibióticos, anti-varroa, etc., antes de iniciar el ensayo de toxicidad habrá que esperar 4 semanas desde el final del último tratamiento.

1.5.2. **Alojamiento y alimentación**

Se emplean jaulas fáciles de limpiar, bien ventiladas, de cualquier material apropiado, como acero inoxidable, tela metálica, plástico, madera desechable, etc., y de tamaño apropiado, es decir, suficientemente espaciosas para el número de abejas. Es preferible colocar grupos de 10 abejas en cada jaula.

Las abejas se mantienen en la oscuridad en un cuarto de experimentación a 25 ± 2 ºC. Debe registrarse a lo largo del ensayo la humedad relativa, que será por lo general del 50-70 %. Tanto el manejo como el tratamiento y las observaciones pueden realizarse con luz (del día). Se alimenta a las abejas con solución acuosa de sacarosa con una concentración final de 500 g/l (50 % w/v). Tras las dosis de ensayo, se las alimenta *ad libi-tum.* El sistema de alimentación debe permitir registrar la ingesta de cada jaula (véase el punto 1.6.3.1). Puede emplearse un tubo de vidrio de unos 50 mm de largo por 10 mm de ancho, con un extremo abierto de unos 2 mm de diámetro.

1.5.3. **Preparación de las abejas**

Se asignan las abejas de forma aleatoria a las jaulas, que se colocan, también de forma aleatoria, en el cuarto de experimentación.

▼B

Conviene suprimir la alimentación de las abejas 2 horas antes de iniciar el ensayo. Se recomienda esta práctica con el fin de que el contenido intestinal de todos los animales sea el mismo cuando comience el ensayo. Deben retirarse las abejas moribundas y sustituirse por otras sanas antes de empezar el ensayo.

1.5.4. **Preparación de las dosis**

Si la sustancia de ensayo puede mezclarse con agua, se añade directamente a una solución de sacarosa al 50 %. Si se trata de productos de calidad técnica o de sustancias escasamente solubles en agua, pueden emplearse disolventes orgánicos, emulgentes o dispersantes poco tóxicos para las abejas (por ejemplo, acetona, dimetilformamida o dimetilsulfóxido). La concentración del excipiente dependerá de la solubilidad de la sustancia de ensayo y ha de ser la misma para todas las concentraciones que se empleen en el ensayo. Por lo general, resulta adecuada una concentración de excipiente del 1 %, que no debe sobrepasarse.

Se preparan soluciones de control adecuadas, lo cual significa que, cuando se utilice un disolvente o dispersante para solubilizar la sustancia de ensayo, han de emplearse dos grupos de control distintos: una solución acuosa y una solución de sacarosa con el disolvente o excipiente a la concentración empleada en las dosis de ensayo.

1.6. PROCEDIMIENTO

1.6.1. **Grupos de ensayo y controles**

El número de dosis y pruebas en paralelo ha de ser suficiente desde el punto de vista estadístico para poder determinar la DL_{50} con un límite de confianza del 95 %. Suele ser necesaria una serie geométrica de 5 dosis con un factor que no sobrepase el 2,2 y que incluya la gama de la DL_{50}. No obstante, el factor de dilución y el número de concentraciones han de determinarse con arreglo a la pendiente de la curva de toxicidad (dosis/mortalidad) y al método estadístico que se haya elegido para analizar los resultados. Las concentraciones apropiadas para el tratamiento pueden establecerse tras un experimento de determinación de gamas.

Con cada concentración de ensayo deben tratarse al menos 3 grupos en paralelo, de 10 abejas cada uno. Además de la serie de ensayo, deben efectuarse al menos 3 lotes de control, de 10 abejas cada uno. También deben efectuarse lotes de control para los disolventes/excipientes que se utilicen (véase el punto 1.5.4).

1.6.2. **Tóxico de referencia**

Debe incluirse un tóxico de referencia en la serie de ensayo. Se utilizarán al menos 3 dosis que abarquen la DL_{50}, prevista. Para cada dosis de ensayo se emplearán al menos 3 jaulas en paralelo, con 10 abejas cada una. El tóxico de referencia idóneo es el dimetoato, cuya DL_{50}-24 horas tras administración oral es del orden de 0,10-0,35 µg p.a./abeja (2). También pueden emplearse otros tóxicos si se dispone de datos suficientes para comprobar que la relación dosis/respuesta es la esperada (por ejemplo, paratión).

▼B

1.6.3. **Exposición**

1.6.3.1. *Administración de las dosis*

Debe administrarse a cada grupo de abejas 100-200 µl de solución acuosa de sacarosa al 50 % con la sustancia de ensayo a la concentración adecuada. Si la sustancia es poco soluble, poco tóxica o su concentración en la formulación es escasa, ha de administrarse un volumen mayor, pues se necesita una mayor cantidad de sustancia en la solución de sacarosa. Se controla la cantidad de alimento tratado que consume cada grupo. Una vez consumido el alimento (por lo general tras 3-4 horas), se retira el comedero de la jaula y se sustituye por otro con solución de sacarosa únicamente, que se proporciona *ad libitum*. El rechazo de la dosis de ensayo de algunos productos a concentraciones superiores puede dar lugar a un consumo escaso o nulo de alimento. Tras un máximo de 6 horas, el alimento tratado que no haya sido consumido se sustituye por solución de sacarosa sola. Se calcula el consumo de alimento tratado (por ejemplo, midiendo el volumen/peso del alimento tratado que haya sobrado).

1.6.3.2. *Duración*

Conviene que el ensayo dure hasta 48 horas después de la sustitución de la solución de ensayo por la de sacarosa sola. Si la mortalidad sigue aumentando en más del 10 % tras las primeras 24 horas, debe prolongarse el ensayo hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

1.6.4. **Observaciones**

Se registra la mortalidad a las 4, las 24 y las 48 horas del inicio del ensayo (es decir, de la administración de la dosis). Si es necesario prolongar el período de observación, se harán registros cada 24 horas, hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

Se calcula la cantidad de alimento consumido en cada grupo. Para saber si el alimento tratado es apetecible puede compararse el consumo de este y el de alimento sin tratar, durante un período de 6 horas.

Debe registrarse todo comportamiento anormal observado durante el período de ensayo.

1.6.5. **Ensayo límite**

En algunos casos (por ejemplo, cuando se piense someter a ensayo una sustancia escasamente tóxica), puede realizarse un ensayo límite con 100 µg p.a./abeja para demostrar que la DL_{50} es superior a ese valor. Debe seguirse el mismo procedimiento, incluidos los 3 grupos de ensayo en paralelo, con la dosis de ensayo, los controles pertinentes, el tóxico de referencia y para el cálculo de la cantidad de alimento tratado que se ha consumido. Si mueren abejas debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos subletales, en caso de producirse (véase el punto 1.6.4).

▼B

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Se resumen los resultados en un cuadro que recoja, para cada grupo tratado, grupo de control y grupo con el tóxico de referencia, el número de abejas empleadas, la mortalidad en cada una de las observaciones y el número de abejas que presenten alteraciones del comportamiento. Se analizan los datos relativos a la mortalidad con métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis por probitas, media móvil, probabilidad bino-mial) (3) (4). Se trazan las curvas de dosis-respuesta correspondientes a todas las observaciones recomendadas y se calculan las pendientes de las mismas y las dosis letales medias (DL_{50}) con un límite de confianza del 95 %. La mortalidad de los controles puede corregirse mediante la corrección de Abbott (4) (5). Si el alimento tratado no se ha consumido en su totalidad, se calcula la cantidad de sustancia de ensayo consumida en cada grupo. La DL_{50} se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes (estabilidad en el agua, presión de vapor, etc.),

— identificación química: fórmula estructural, pureza, etc. (en el caso de los plaguicidas, identidad y concentración del principio o principios activos).

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica, raza, edad aproximada (en semanas), método y fecha de recolección,

— información sobre las colonias de donde proceden las abejas de ensayo: estado de salud, enfermedades de los sujetos adultos, tratamientos previos, etc.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— temperatura y humedad relativa en el cuarto de experimentación,

— condiciones de alojamiento, incluido el tipo, tamaño y material de las jaulas,

— método de preparación de la solución madre y de ensayo (en su caso, el disolvente y su concentración),

— diseño del ensayo, por ejemplo, número de concentraciones y concentraciones de ensayo, número de controles, etc.,

— para cada concentración de ensayo y control, número de jaulas utilizadas en paralelo y número de abejas por jaula, fecha del ensayo.

▼B

2.2.4. **Resultados:**

— resultados del estudio previo de determinación de gamas, si procede,

— datos en bruto: mortalidad con cada dosis de ensayo en cada período de observación,

— gráfico de las curvas de dosis-respuesta al final del ensayo,

— valores de la DL_{50} con un límite de confianza del 95 % en cada período de observación recomendado, con la sustancia de ensayo y el tóxico de referencia,

— métodos estadísticos empleados para calcular la DL_{50},

— mortalidad en los controles,

— otros efectos biológicos observados o medidos en las abejas, como alteraciones del comportamiento (incluido el rechazo de la sustancia de ensayo), tasa de consumo del alimento tratado y sin tratar, etc.,

— toda desviación de los protocolos de ensayo aquí descritos y cualquier otra información de interés.

3. **REFERENCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. Marzo de 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera L.)* 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.

(3) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour, Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3ª ed., Cambridge, Londres y Nueva York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

▼B

C.17. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR CONTACTO EN ABEJAS

1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad aguda reproduce las directrices del documento OCDE TG 214 (1998).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad consiste en un método de laboratorio diseñado para determinar la toxicidad aguda por contacto de los productos fitosanitarios y otros productos químicos en abejas obreras adultas.

Para determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser preciso estudiar la toxicidad aguda por contacto en abejas, por ejemplo, cuando es probable que estas queden expuestas a un producto químico determinado. El ensayo de toxicidad aguda por contacto se realiza para determinar la toxicidad inherente de los plaguicidas y otras sustancias para las abejas. Sus resultados se emplean para saber si es necesario profundizar en la evaluación. En particular, el método puede emplearse en programas de evaluación del peligro de los plaguicidas para las abejas, basados en una progresión secuencial desde los ensayos de toxicidad en laboratorio hasta los experimentos de semicampo y de campo (1). Los plaguicidas pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados.

Debe emplearse un tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de las abejas y la precisión del procedimiento de ensayo.

1.2. DEFINICIONES

Toxicidad aguda por contacto: efectos nocivos que se manifiestan durante un período máximo de 96 horas tras la aplicación tópica de una dosis única de una sustancia.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo aplicada. Se expresa en peso de la sustancia por animal de ensayo (μg/abeja).

DL_{50} (dosis letal media) por contacto: dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia que puede provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya aplicado. La DL_{50} se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja. En el caso de los plaguicidas, la sustancia de ensayo puede ser un principio activo (p.a.) o un producto formulado que contenga uno o varios principios activos.

Mortalidad: número de animales muertos, es decir, completamente inmóviles.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se expone a las abejas obreras adultas *(Apis mellifera),* por aplicación directa en el tórax (gotitas), a una gama de dosis de la sustancia de ensayo disuelta en un excipiente adecuado. El ensayo dura 48 horas. Si la tasa de mortalidad aumenta entre las 24 y las 48 horas y la mortalidad del control permanece a un nivel aceptable, es decir, <10 %, está indicado prolongar el ensayo hasta un máximo de 96 horas. Se registra la mortalidad todos los días y se compara con las cifras del control. Se analizan los resultados para calcular la DL_{50} a las 24 y a las 48 horas y, en caso de que se haya prolongado el estudio, a las 72 y a las 96 horas.

▼B

1.4. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

— la mortalidad media del total de los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo,

— la DL_{50} del tóxico de referencia debe ajustarse a la gama especificada.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Recolección de las abejas**

Deben emplearse ejemplares adultos jóvenes de abejas obreras de la misma raza, edad, alimentación, etc. Las abejas han de proceder de colonias sanas y bien alimentadas, a ser posible sin enfermedades y con reina, y con antecedentes y estado fisiológico conocidos. Pueden recolectarse la mañana del día en que vaya a reali-zarse el ensayo, o la víspera por la tarde y mantenerse en condiciones de ensayo hasta el día siguiente. Pueden emplearse abejas procedentes de cuadros sin cría, pero debe evitarse la recolección a principios de la primavera o finales del otoño, pues en esas épocas las abejas modifican su fisiología. Si es preciso realizar el ensayo en esas épocas, las abejas pueden colocarse en una incubadora y criarse durante una semana con pan de abejas (polen tomado del panal) y solución de sacarosa. Si se utilizan abejas tratadas con productos químicos como antibióticos, anti-varroa, etc., antes de iniciar el ensayo de toxicidad habrá que esperar 4 semanas desde el final del último tratamiento.

1.5.2. **Alojamiento y alimentación**

Se emplean jaulas fáciles de limpiar, bien ventiladas, de cualquier material apropiado, como acero inoxidable, tela metálica, plástico, madera desechable, etc., y de tamaño apropiado, es decir, suficientemente espaciosas para el número de abejas. Es preferible colocar grupos de 10 abejas en cada jaula.

Las abejas se mantienen en la oscuridad en un cuarto de experimentación a 25 ± 2 ºC Debe registrarse a lo largo del ensayo la humedad relativa, que será por lo general del 50-70 %. Tanto el manejo como el tratamiento y las observaciones pueden realizarse con luz (del día). Se alimenta a las abejas con solución acuosa de sacarosa con una concentración final de 500 g/l (50 % w/v). Esta se proporciona *ad libitum* mientras dure el ensayo en un comedero de abejas, que puede ser un tubo de vidrio de unos 50 mm de largo por 10 mm de ancho, con un extremo abierto de unos 2 mm de diámetro.

1.5.3. **Preparación de las abejas**

Antes de aplicar la sustancia de ensayo, pueden anestesiarse las abejas con anhídrido carbónico o nitrógeno. Debe reducirse al mínimo la cantidad de anestésico aplicado y el tiempo de exposición. Se retiran las abejas moribundas y se sustituyen por otras sanas antes de empezar el ensayo.

1.5.4. **Preparación de las dosis**

La sustancia de ensayo se diluye en un excipiente, que puede ser un disolvente orgánico o una solución acuosa con un humectante. La acetona es el disolvente orgánico más conveniente, si bien pueden emplearse otros escasamente tóxicos para las abejas (por ejemplo, dimetilformamida o dimetilsulfóxido). Si se trata de formulados dispersados en agua o de sustancias orgánicas de gran polaridad insolubles en disolventes orgánicos, puede resultar más fácil aplicarlos en una solución débil de un humectante de una marca comercial (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween, etc.).

▼B

Se preparan soluciones de control adecuadas, lo cual significa que, cuando se utilice un disolvente o dispersante para solubilizar la sustancia de ensayo, han de emplearse dos grupos de control distintos: uno con agua y otro con disolvente/dispersante.

1.6. PROCEDIMIENTO

1.6.1. **Grupos de ensayo y controles**

El número de dosis y pruebas en paralelo ha de ser suficiente desde el punto de vista estadístico para poder determinar la DL_{50} con un límite de confianza del 95 %. Suele ser necesaria una serie geométrica de 5 dosis con un factor que no sobrepase el 2,2 y que incluya la gama de la DL_{50}. No obstante, el número de concentraciones ha de determinarse con arreglo a la pendiente de la curva de toxicidad (dosis/mortalidad) y al método estadístico que se haya elegido para analizar los resultados. Las concentraciones apropiadas para el tratamiento pueden establecerse tras un experimento de determinación de gamas.

Con cada concentración de ensayo deben tratarse al menos 3 grupos en paralelo, de 10 abejas cada uno.

Además de la serie de ensayo, deben efectuarse al menos 3 lotes de control, de 10 abejas cada uno. En su caso, deben hacerse 3 lotes de control adicionales, de 10 abejas cada uno, con el disolvente orgánico o humectante.

1.6.2. **Tóxico de referencia**

Debe incluirse un tóxico de referencia en la serie de ensayo. Se utilizarán al menos 3 dosis que abarquen la DL_{50} prevista. Para cada dosis de ensayo se emplearán al menos 3 jaulas en paralelo, con 10 abejas cada una. El tóxico de referencia idóneo es el dimetoato, cuya DL_{50}-24 horas por contacto es del orden de 0,10-0,35μg p.a./abeja (2). También pueden emplearse otros tóxicos si se dispone de datos suficientes para comprobar que la relación dosis/respuesta es la esperada (por ejemplo, paratión).

1.6.3. **Exposición**

1.6.3.1. *Administración de las dosis*

Se hace una aplicación local a cada una de las abejas anestesiadas. Las abejas se asignan de forma aleatoria para las distintas dosis de ensayo y los controles. Con un microaplicador, se aplica a cada abeja en la cara dorsal del tórax 1 μl de solución con sustancia de ensayo a la concentración adecuada. Si procede, pueden aplicarse otros volúmenes. Después de la aplicación, se colocan las abejas en las jaulas de ensayo y se les proporciona solución de sacarosa.

1.6.3.2. *Duración*

Conviene que el ensayo dure 48 horas. Si la mortalidad sigue aumentando en más del 10 % entre las 24 y las 48 horas, debe prolongarse el ensayo hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

▼B

1.6.4. **Observaciones**

Se registra la mortalidad a las 4, las 24 y las 48 horas de la administración de la dosis. Si es necesario prolongar el período de observación, se harán registros cada 24 horas, hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

Debe registrarse todo comportamiento anormal observado durante el período de ensayo.

1.6.5. **Ensayo límite**

En algunos casos (por ejemplo, cuando se piense someter a ensayo una sustancia escasamente tóxica), puede realizarse un ensayo límite con 100 μg p.a./abeja para demostrar que la DL_{50} es superior a ese valor. Debe seguirse el mismo procedimiento, incluidos los 3 grupos de ensayo en paralelo, con la dosis de ensayo, los controles pertinentes y el tóxico de referencia. Si mueren abejas debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos subletales, en caso de producirse (véase el punto 1.6.4).

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Se resumen los resultados en un cuadro que recoja, para cada grupo tratado, grupo de control y grupo con el tóxico de referencia, el número de abejas empleadas, la mortalidad en cada una de las observaciones y el número de abejas que presenten alteraciones del comportamiento. Se analizan los datos relativos a la mortalidad con métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis por probitas, media móvil, probabilidad bino-mial) (3) (4). Se trazan las curvas de dosis-respuesta correspondientes a todas las observaciones recomendadas (a las 24, 48 y, en su caso, 72 horas y 96 horas) y se calculan las pendientes de las mismas y las dosis letales medias (DL_{50}) con un límite de confianza del 95 %. La mortalidad de los controles puede corregirse mediante la corrección de Abbott (4) (5). La DL_{50}, se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza fisica y propiedades fisicoquímicas (estabilidad en el agua, presión de vapor, etc.),

— identificación química: fórmula estructural, pureza, etc. (en el caso de los plaguicidas, identidad y concentración del principio o principios activos).

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica, raza, edad aproximada (en semanas), método y fecha de recolección,

— información sobre las colonias de donde proceden las abejas de ensayo: estado de salud, enfermedades de los sujetos adultos, tratamientos previos, etc.

▼B

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— temperatura y humedad relativa en el cuarto de experimentación,

— condiciones de alojamiento, incluido el tipo, tamaño y material de las jaulas,

— método de administración de la sustancia de ensayo: disolvente, volumen de solución de ensayo, anestésicos empleados, etc.,

— diseño del ensayo, por ejemplo, número de concentraciones y concentraciones de ensayo, número de controles, etc.; para cada concentración de ensayo y control, número de jaulas utilizadas en paralelo y número de abejas por jaula,

— fecha del ensayo.

2.2.4. **Resultados:**

— resultados del estudio previo de determinación de gamas, si procede,

— datos en bruto: mortalidad con cada concentración de ensayo en cada período de observación,

— gráfico de las curvas de dosis-respuesta al final del ensayo,

— valores de la DL_{50} con un límite de confianza del 95 % en cada período de observación recomendado, con la sustancia de ensayo y el tóxico de referencia,

— métodos estadísticos empleados para calcular la DL_{50},

— mortalidad en los controles,

— otros efectos biológicos observados o medidos en las abejas, así como cualquier reacción anormal,

— toda desviación de los protocolos de ensayo aquí descritos y cualquier otra información de interés.

3. **REFERENCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N. 1, 151-165. Marzo de 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera L.* ,1981-1992. Journal of Apicultural Research 22119-125.

(3) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3ª ed., Cambridge, Londres y Nueva York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

▼B

C.18. ADSORCIÓN/DESORCIÓN SEGÚN UN MÉTODO DE EQUILIBRIO POR LOTES

1. MÉTODO

Este método reproduce las directrices de la OCDE TG 106 para la determinación de la adsorción/desorción en el suelo, según un método de equilibrio por lotes (2000).

1.1. INTRODUCCIÓN

El método tiene en cuenta una prueba de anillo y un taller para la selección de suelo con vistas al desarrollo de una prueba de adsorción (1) (2) (3) (4), así como distintas directrices nacionales vigentes (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Los estudios de adsorción/desorción son útiles para proporcionar información esencial sobre la movilidad de las sustancias químicas y su distribución en los compartimentos edáfico, acuático y aéreo de la biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Esta información puede ser utilizada en la predicción o estimación, por ejemplo, de la capacidad de una sustancia química para su degradación (22) (23), transformación y absorción por organismos (24), lixiviación a través del perfil edáfico (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), volatilidad desde el suelo (21) (29) (30) o arrastre desde la tierra hasta las aguas naturales (18) (31) (32). Los datos de adsorción pueden utilizarse para establecer comparaciones y modelos (19) (33) (34) (35).

La distribución de una sustancia química entre las fases edáfica y acuosa es un proceso complejo que depende de diversos factores: la naturaleza química de la sustancia (12) (36) (37) (38) (39) (40), las características del suelo (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) y factores climáticos tales como las precipitaciones, la temperatura, la luz solar y el viento. Así pues, los numerosos fenómenos y mecanismos implicados en el proceso de adsorción de una sustancia química por el suelo no pueden definirse completamente con un modelo simplificado de laboratorio como es el presente método. Sin embargo, esta tentativa, aunque no puede cubrir todos los casos ambientalmente posibles, proporciona información valiosa sobre la importancia ambiental de la adsorción de una sustancia química.

Véase también la Introducción general.

1.2. OBJETO

El objeto del método es estimar el comportamiento de adsorción/desorción de una sustancia en los suelos. Lo que se pretende es obtener un valor de sorción que pueda utilizarse para predecir el reparto en diversas condiciones ambientales; con este fin, se determinan los coeficientes de adsorción en el equilibrio de una sustancia química en diversos suelos en función de las características de estos (por ejemplo, contenido de carbono orgánico, contenido de arcilla y textura del suelo y pH). Hay que utilizar diversos tipos de suelo para cubrir lo más ampliamente posible las interacciones de una sustancia dada con suelos naturales.

En este método, la adsorción representa el proceso de enlace de una sustancia química a las superficies de los suelos; no se distingue entre diversos procesos de adsorción (adsorción física y química) y procesos tales como la degradación catalizada en superficie, la adsorción en la masa o las reacciones químicas. La adsorción que pueda darse en las partículas coloidales (diámetro < 0,2 μm) generadas por los suelos no se tiene en cuenta completamente.

▼B

Los parámetros del suelo que se consideran más importantes para la adsorción son los siguientes: contenido de carbono orgánico (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); contenido de arcilla y textura del suelo (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) y pH para los compuestos ionizables (3) (4) (42). Otros parámetros del suelo que pueden influir en la adsorción/desorción de determinadas sustancias son la capacidad efectiva de intercambio catiónico (ECEC), el contenido de óxidos amorfos de hierro y aluminio, particularmente en caso de suelos volcánicos y tropicales (4), y la superficie específica (49).

La prueba se diseña para evaluar la adsorción de una sustancia química en distintos tipos de suelo con una amplia gama de contenido de carbono orgánico, contenido de arcilla y textura del suelo, y pH. Comprende tres etapas:

Etapa 1: Estudio preliminar para determinar:

— la proporción suelo/solución,

— el tiempo de equilibrio para la adsorción y la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio,

— la adsorción de la sustancia problema en las superficies de los recipientes del ensayo y la estabilidad de dicha sustancia durante el período de prueba.

Etapa 2: Prueba de barrido: se estudia la adsorción en 5 tipos diversos de suelo mediante cinética de adsorción con una sola concentración y determinación del coeficiente de distribución K_d y K_{oc}.

Etapa 3: Determinación de las isotermas de adsorción de Freundlich para determinar la influencia de la concentración sobre el grado de adsorción en los suelos.

Estudio de la desorción mediante cinética de desorción/isotermas de desorción de Freundlich (apéndice 1).

1.3. DEFINICIONES Y UNIDADES

Símbolo	Definición	Unidad
A_{t_i}	Adsorción porcentual al tiempo t_i	%
A_{eq}	Adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción	%
$m_s^{ads}(t_i)$	Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo al tiempo t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo durante el intervalo de tiempo Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción	µg
m_0	Masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al principio de la prueba de adsorción	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	Masa de la sustancia problema medida en una alícuota ($v_a{}^A$) al tiempo t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	Masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción	µg
m_{soil}	Cantidad de la fase edáfica, expresada en masa seca de suelo	g

▼B

Símbolo	Definición	Unidad
C_{st}	Concentración en masa de la solución madre de la sustancia	µg cm^{-3}
C_0	Concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	Concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa al tiempo t_i en que se realiza el análisis	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	Contenido de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	Concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de adsorción	µg cm^{-3}
V_0	Volumen inicial de la fase acuosa en contacto con el suelo durante la prueba de adsorción	cm^3
v_a^A	Volumen de la alícuota en que se mide la sustancia problema	cm^3
K_d	Coeficiente de distribución de la adsorción	cm^{-3} g^{-1}
K_{oc}	Coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico	cm^3
K_{om}	Coeficiente de distribución, normalizado para tener en cuenta la materia orgánica	cm^3g^{-1}
K_F^{ads}	Coeficiente de adsorción de Freundlich	-1/n (cm^3) 1/n $g^{—1}$
l/n	Exponente de Freundlich	
D_{t_i}	Desorción porcentual al tiempo t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	Desorción porcentual en el intervalo de tiempo Δt_i	%
K_{des}	Coeficiente de desorción aparente	cm^3
$K_F{}^{des}$	Coeficiente de desorción de Freundlich	µg $^{-11/n}$ (cm^3) $1/ng^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	Masa de la sustancia problema desorbida del suelo al tiempo t_i	µg
$m_m{}^{des}(\Delta t_i)$	Masa de la sustancia problema desorbida del suelo durante el intervalo de tiempo Δt_i	µg
$m_m{}^{des}(eq)$	Masa de la sustancia determinada analíticamente en la fase acuosa en el equilibrio de desorción	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	Masa total de la sustancia problema desorbida en el equilibrio de desorción	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	Masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo después del intervalo de tiempo Δt_i	µg
m_{aq}^A	Masa de la sustancia que queda en solución después de alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen	µg
$C_s^{des}(eq)$	Contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción	µg g^{-1}

▼B

Símbolo	Definición	Unidad
$C_{aq}^{des}(eq)$	Concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio de desorción	$\mu g\ cm^{-3}$
v_T	Volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante el experimento de cinética de desorción llevado a cabo con el método en serie	cm^3
v_R	Volumen del sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $CaCl_2$ 0,01 M	cm^3
v_a^D	Volumen de la alícuota tomada para el análisis a partir del tiempo (i), durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie	cm^3
$V_{ra}i^D$	Volumen de la solución tomada del tubo (i) para la medida de la sustancia problema, en el experimento de cinética de desorción (método paralelo)	cm^3
V_r^F	Volumen de la solución tomada del tubo para la medida de la sustancia problema, en el equilibrio de desorción	cm^3
MB	Balance de masa	%
m_E	Masa total de la sustancia problema extraída del suelo y de las paredes del recipiente del ensayo en dos pasos	µg
V_{rec}	Volumen del sobrenadante recuperado después del equilibrio de adsorción	cm^3
p_{ow}	Coeficiente de reparto octanol/agua	
pKa	Constante de disociación	
S_w	Hidrosolubilidad	gl^{-1}

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

A las muestras de suelo de peso seco conocido que se han preequilibrado en $CaCl_2$ 0,01 M se añaden volúmenes conocidos de soluciones de concentración también conocida de la sustancia problema, no marcada ni radiomarcada, en $CaCl_2$ 0,01 M. La mezcla se agita durante un tiempo adecuado. Las suspensiones de suelo se separan entonces por centrifugación y, si se desea, por filtración, y se analiza la fase acuosa. La cantidad de sustancia problema adsorbida en la muestra de suelo se calcula como la diferencia entre la cantidad de sustancia problema inicialmente presente en la solución y la cantidad que permanece al final del experimento (método indirecto).

Como opción, la cantidad de sustancia problema adsorbida puede determinarse también directamente por análisis del suelo (método directo). Este procedimiento, que implica someter el suelo a extracción gradual con el solvente apropiado, se recomienda en caso de que no pueda determinarse exactamente la diferencia de concentración de la sustancia en la solución. Los siguientes son ejemplos de tales casos: adsorción de la sustancia problema en la superficie de los recipientes del ensayo, inestabilidad de la sustancia problema en la escala de tiempo del experimento, adsorción débil que dé solamente un pequeño cambio de concentración en la solu-ción, y adsorción fuerte que deje una concentración tan baja que no pueda determinarse exactamente. Si se utiliza una sustancia radiomarcada, la extracción del suelo puede evitarse mediante análisis de la fase edáfica por combustión y recuento de centelleo líquido. Sin embargo, el recuento de centelleo líquido es una técnica inespecífica que no puede distinguir entre productos parentales y productos de transformación; por lo tanto, debe utilizarse solamente si la sustancia problema es estable durante la duración del estudio.

▼B

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Los reactivos químicos deben ser de grado analítico. Se recomienda el uso de sustancias problema no marcadas de composición conocida y pureza preferiblemente del 95 %, al menos, o de sustancias problema radio-marcadas de composición y radiopureza conocidas. En caso de marcadores de semivida breve, deben aplicarse correcciones para tener en cuenta su desintegración.

Antes de llevar a cabo una prueba de adsorción/desorción, debe disponerse de la siguiente información sobre la sustancia problema:

a) hidrosolubilidad (A.6);

b) presión de vapor (A.4) o constante de la ley de Henry;

c) degradación abiótica: hidrólisis en función del pH (C.7);

d) coeficiente de reparto (A.8);

e) biodegradabilidad fácil (C.4) o transformación aerobia y anaerobia en el suelo;

f) pKa de las sustancias ionizables;

g) fotólisis directa en agua (es decir, espectro de absorción ultravioleta-visible en el agua, rendimiento cuántico) y fotodegradación en el suelo.

1.6. APLICABILIDAD DE LA PRUEBA

La prueba es aplicable a las sustancias químicas respecto de las cuales se dispone de un método analítico con la suficiente exactitud. Un parámetro importante que puede influir en la fiabilidad de los resultados, especialmente cuando se sigue el método indirecto, es la estabilidad de la sustancia problema en la escala de tiempo de la prueba. Así pues, es necesario comprobar la estabilidad en un estudio preliminar; si se observa alguna transformación en la escala de tiempo de la prueba, se recomienda que el estudio principal se realice analizando tanto la fase edáfica como la acuosa.

Pueden surgir dificultades en la realización de esta prueba con sustancias problema cuya hidrosolubilidad sea baja ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), así como con sustancias muy cargadas, debido al hecho de que la concentración en la fase acuosa no puede medirse analíticamente con la suficiente exactitud. En estos casos hay que tomar medidas adicionales. En las secciones pertinentes del presente método se dan indicaciones sobre cómo tratar estos problemas.

Al probar sustancias volátiles, debe tenerse cuidado para evitar pérdidas durante el estudio.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1. **Instrumentos y reactivos químicos**

Equipo normal de laboratorio, especialmente el siguiente:

a) tubos o recipientes para llevar a cabo los experimentos. Es importante que estos tubos o recipientes:

— ajusten directamente en la centrifugadora para minimizar los errores de manipulación y transferencia,

— estén hechos de un material inerte que minimice la adsorción de la sustancia problema en su superficie;

▼B

b) dispositivo de agitación: agitador rotatorio o equipo equivalente: el dispositivo de agitación debe mantener el suelo en suspensión durante la agitación;

c) centrifugadora: preferiblemente de alta velocidad con, por ejemplo, fuerzas de centrifugación > 3 000 g, con temperatura controlada, capaces de retirar de la solución acuosa partículas con un diámetro mayor de 0,2 μm. Los recipientes deben estar cerrados durante la agitación y la centrifugación para evitar fenómenos de volatilidad y pérdidas de agua; para minimizar la adsorción sobre ellos, deben utilizarse tapones desactivados, tales como tapones de rosca con revestimiento de teflón;

d) opcional: dispositivo de filtración: filtros de 0,2 μm de porosidad, estériles, de un solo uso. Debe tenerse especial cuidado en la selección del material del filtro, a fin de evitar cualquier pérdida de la sustancia problema sobre él; para las sustancias problema poco solubles no se recomienda usar material orgánico;

e) instrumentación analítica, adecuada para medir la concentración de la sustancia problema;

f) estufa de laboratorio, capaz de mantener una temperatura de 103 a 110 ºC.

1.7.2. **Caracterización y selección de los suelos**

Los suelos deben caracterizarse por tres parámetros considerados en gran parte responsables de la capacidad de adsorción: carbono orgánico, contenido de arcilla y textura de suelo, y pH. Como ya se ha mencionado (véase el punto 1.2) la adsorción/desorción de ciertas sustancias puede verse afectada por otras propiedades fisicoquímicas del suelo, que deben considerarse en tales casos.

Los métodos utilizados para la caracterización de suelo son muy importantes y pueden tener una influencia significativa en los resultados. Por lo tanto, se recomienda que se mida el pH del suelo en una solución de $CaCl_2$ 0,01 M (que es la solución utilizada en la prueba de adsorción/desorción) según el método correspondiente de la ISO (por ejemplo, ISO-10390-1). También se recomienda que las otras propiedades pertinentes del suelo se determinen según métodos normalizados [por ejemplo, el Manual de análisis de suelo *(Handbook of Soil Analysis)]* de la ISO: esto permite que el análisis de los datos de sorción se base en parámetros del suelo normalizados en conjunto. En el punto 3, «Referencias» (50-52), se da información sobre métodos normalizados existentes de análisis y caracterización del suelo. Para el calibrado de los métodos de prueba del suelo, se recomienda el uso de suelos de referencia.

En el cuadro 1 se da información sobre la selección de suelos para los experimentos de adsorción/desorción. Los 7 suelos seleccionados cubren los tipos de suelo de las zonas geográficas templadas. En caso de sustancias problema ionizables, los suelos seleccionados deben cubrir una gama amplia de pH, para poder evaluar la adsorción de la sustancia en sus formas ionizada y no ionizada. En el punto 1.9, «Realización de la prueba», figuran orientaciones sobre cuántos suelos distintos han de utilizarse en las diversas fases de la prueba.

Si se prefieren otros tipos de suelo, deben caracterizarse por los mismos parámetros y ser similares a los descritos en el cuadro 1 en cuanto a la variación de sus propiedades, incluso aunque no se ajusten exactamente a los criterios.

▼B

Cuadro 1

Información sobre la selección de muestras de suelo para los estudios de adsorción/desorción

Tipo de suelo	Gama de pH (en $CaCl_2$ 0,01 M)	Contenido de carbono orgánico (%)	Contenido de arcilla (%)	Textura del suelo ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	Arcilla
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	Franco-arcilloso
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	Franco-limoso
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	Franco
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	< 0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10-15 ([2])	Franco-arenoso
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ([2]) ([3])	40-65	Franco-arcilloso/ arcilla
7	< 4,5	> 10	< 10	Arena/franco-arenoso

([1]) Según el sistema de la FAO y los Estados Unidos de América (85).
([2]) Las variables respectivas deben mostrar preferentemente valores dentro de la gama considerada. Si, no obstante, hay dificultades para encontrar material de suelo adecuado, se aceptarán valores por debajo del mínimo indicado.
([3]) Los suelos con menos del 0,3 % de carbono orgánico pueden perturbar la correlación entre el contenido orgánico y la adsorción. Así pues, se recomienda el uso de suelos con un contenido mínimo de carbono orgánico del 0,3 %.

1.7.3. **Recogida y conservación de muestras de suelo**

1.7.3.1. *Recogida*

No se recomienda ninguna técnica o herramienta de muestreo específica; la técnica de muestreo depende del propósito del estudio (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Deben considerarse los elementos siguientes:

a) es necesario tener información detallada sobre las circunstancias del yacimiento, incluyendo la situación, cubierta vegetal, tratamientos con plaguicidas y fertilizantes, adiciones biológicas o contaminación accidental. Deben seguirse las recomendaciones de la norma de la ISO sobre muestreo del suelo (ISO 10381-6) en cuanto a la descripción del sitio de muestreo;

b) hay que definir el sitio de muestreo por sus coordenadas UTM (proyección universal transversal de Merca-tor/cero geodésico horizontal europeo) o geográficas; así se puede volver a recoger en el futuro un suelo particular o definir el suelo bajo diversos sistemas de clasificación utilizados en países diferentes. Solamente debe recogerse el horizonte A hasta una profundidad máxima de 20 cm. Especialmente en el caso del suelo de tipo 7, si hay un horizonte O_h, presente como parte del suelo, debe incluirse en el muestreo.

Las muestras de suelo deben transportarse utilizando recipientes y bajo condiciones de temperatura que garanticen que no se alteran perceptiblemente las propiedades iniciales del suelo.

▼B

1.7.3.2. *Conservción*

Se prefiere el uso de suelos tomados recientemente del yacimiento. Solamente si esto no es posible, el suelo puede conservarse a temperatura ambiente y secado al aire. No se recomienda ningún límite de tiempo de conservación, pero los suelos almacenados durante más de 3 años deben volver a analizarse en cuanto a su contenido de carbono orgánico, pH y capacidad de intercambio catiónico (CEC), antes de que se utilicen.

1.7.3.3. *Manipulación y preparación de las muestras de suelo para la prueba*

Los suelos se secan al aire a temperatura ambiente (preferiblemente entre 20 y 25 ºC). La desagregación debe llevarse a cabo con la fuerza mínima, de modo que la textura original del suelo cambie lo menos posible. Los suelos se tamizan a un tamaño de partícula ≤ 2 mm; deben seguirse las recomendaciones de la norma de la ISO sobre muestreo de suelo (ISO 10381-6) en cuanto al proceso de tamizado. Se recomienda una homoge-neización cuidadosa, ya que aumenta la reproducibilidad de los resultados. El índice de humedad de cada suelo se determina en tres alícuotas mediante calentamiento a 105 ºC hasta que no haya ningún cambio significativo en el peso (aproximadamente 12 horas). Para todos los cálculos, la masa del suelo hace referencia a la masa seca en estufa, es decir, el peso del suelo corregido para descontar el índice de humedad.

1.7.4. **Preparación de la sustancia problema para su aplicación al suelo**

La sustancia problema se disuelve en una solución de $CaCl_2$ 0,01 M en agua destilada o desionizada; la solución de $CaCl_2$ se utiliza como fase solvente acuosa para mejorar la centrifugación y minimizar el intercambio catiónico. La concentración de la solución madre debe ser preferiblemente 3 órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico utilizado. Este umbral garantiza la exactitud de las medidas en cuanto a la metodología seguida en este método; además, la concentración de la solución madre debe estar por debajo de la hidrosolubilidad de la sustancia problema.

La solución madre debe prepararse de preferencia justo antes de la aplicación a las muestras de suelo y debe guardarse cerrada en la oscuridad a 4 ºC. El tiempo de conservación depende de la estabilidad de la sustancia problema y de su concentración en la solución.

Solamente en el caso de las sustancias poco solubles ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), puede ser necesario añadir un agente de solubilización apropiado cuando sea difícil disolver la sustancia problema. Este agente de solubilización: a) debe ser miscible con agua, como el metanol o el acetonitrilo; b) su concentración no debe exceder del 1 % del volumen total de la solución madre y debe constituir menos de ese límite en la solución de la sustancia problema que se vaya a poner en contacto con el suelo (preferentemente menos del 0,1 %), y c) no debe ser un agente tensoactivo ni experimentar reacciones solvolíticas con la sustancia problema. El uso de un agente de solubilización debe constar y justificarse en el informe sobre los datos.

Otra opción para sustancias poco solubles es añadir al sistema de prueba sustancia problema ya disuelta: esta sustancia se disuelve en un solvente orgánico, del cual se añade una alícuota al sistema de suelo y solución de $CaCl_2$ 0,01 M en agua destilada o desionizada. El contenido del solvente orgánico en la fase acuosa debe mantenerse lo más bajo posible, normalmente sin exceder del 0,1 %. La utilización de un solvente orgánico puede adolecer de irreproducibilidad del volumen. Así pues, puede introducirse un error adicional ya que la concentración de sustancia problema y de cosolvente no será la misma en todas las pruebas.

▼B

1.8. REQUISITOS PREVIOS PARA LLEVAR A CABO LA PRUEBA DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN

1.8.1. **Método analítico**

Entre los parámetros clave que pueden influir en la exactitud de las medidas de sorción se incluyen la exactitud del método analítico en el análisis de las fases tanto de solución como adsorbida, la estabilidad y la pureza de la sustancia problema, el logro del equilibrio de sorción, la magnitud del cambio de concentración de la solución, la proporción suelo/solución y los cambios en la estructura del suelo durante el proceso de equilibrado (35) (59) (60) (61) (62). En el apéndice 2 figuran algunos ejemplos donde se tratan estos problemas de exactitud.

Debe comprobarse la fiabilidad del método analítico utilizado en la gama de concentración que pueda darse durante la prueba. El experimentador debe ser libre para elaborar un método apropiado con la exactitud, la precisión, la reproducibilidad, los límites de detección y la recuperación apropiados. A continuación se dan orientaciones sobre cómo llevar a cabo tal prueba.

Un volumen apropiado de $CaCl_2$ 0,01 M (por ejemplo, 100 cm^3) se agita durante 4 horas con un peso determinado de suelo (por ejemplo, 20 g) de alta capacidad de adsorción, es decir, con un alto contenido de carbono orgánico y de arcilla; estos pesos y volúmenes pueden variar dependiendo de las necesidades analíticas, pero una proporción suelo/solución de 1:5 es un punto de partida conveniente. Se centrifuga la mezcla y puede filtrarse la fase acuosa. Se añade a esta cierto volumen de la solución madre de sustancia problema para alcanzar una concentración nominal dentro de la gama de concentración que pueda darse durante la prueba. Este volumen no debe exceder del 10 % del volumen final de la fase acuosa, para cambiar lo menos posible la naturaleza de la solución de preequilibrado. Se analiza la solución.

Debe realizarse una prueba en blanco con el sistema suelo + solución de $CaCl_2$ (sin la sustancia problema), para comprobar la presencia de artefactos en el método analítico y de efectos de matriz causados por el suelo.

Entre los métodos analíticos que pueden utilizarse para las medidas de sorción se incluyen la cromatografía gas-líquido (GLC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la espectrometría (por ejemplo, cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, HPLC/espectrometría de masas) y el recuento de centelleo líquido (para sustancias radiomarcadas). Sea cual sea el método analítico utilizado, se considera conveniente si la recuperación está entre el 90 y el 110 % del valor nominal. Para permitir la detección y la evaluación después de que haya tenido lugar el reparto, los límites de detección del método analítico deben estar al menos 2 órdenes de magnitud por debajo de la concentración nominal.

Las características y los límites de detección del método analítico disponible para llevar a cabo los estudios de adsorción desempeñan un papel importante en la definición de las condiciones de prueba y de la realización de todo el experimento. Este método sigue una vía experimental general y proporciona recomendaciones y orientaciones sobre soluciones alternativas cuando el método analítico y las instalaciones de laboratorio impongan limitaciones.

▼B

1.8.2. **Selección de las proporciones óptimas suelo/solución**

La selección de proporciones apropiadas suelo/solución para los estudios de sorción depende del coeficiente de distribución K_d y del grado relativo de adsorción deseado. El cambio de concentración de la sustancia en la solución determina la exactitud estadística de la medida basada en la forma de la ecuación de adsorción y el límite de la metodología analítica, respecto a la detección de la concentración de la sustancia química en la solución. Por lo tanto, en la práctica general es útil partir de algunas proporciones fijadas, para las cuales el porcentaje adsorbido sea de más del 20 %, y preferiblemente > 50 % (62), mientras que debe tenerse cuidado para mantener bastante alta la concentración de sustancia problema en la fase acuosa a fin de poder medirla con exactitud. Esto es particularmente importante en caso de altos porcentajes de adsorción.

Un planteamiento conveniente de la selección de las proporciones adecuadas suelo/agua se basa en una estimación del valor de K_d por estudios preliminares o por técnicas aceptadas de estimación (apéndice 3). La selección de una proporción adecuada puede entonces basarse en la gráfica de la proporción suelo/solución frente a Kd con porcentajes fijos de adsorción (figura 1). En esta gráfica se asume que la ecuación de adsorción es lineal ([1]). La relación aplicable se obtiene reordenando la ecuación (4) de Kd en la forma de la ecuación (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

o en su forma logarítmica suponiendo que $R = m_{soil}/V_0$ y $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$

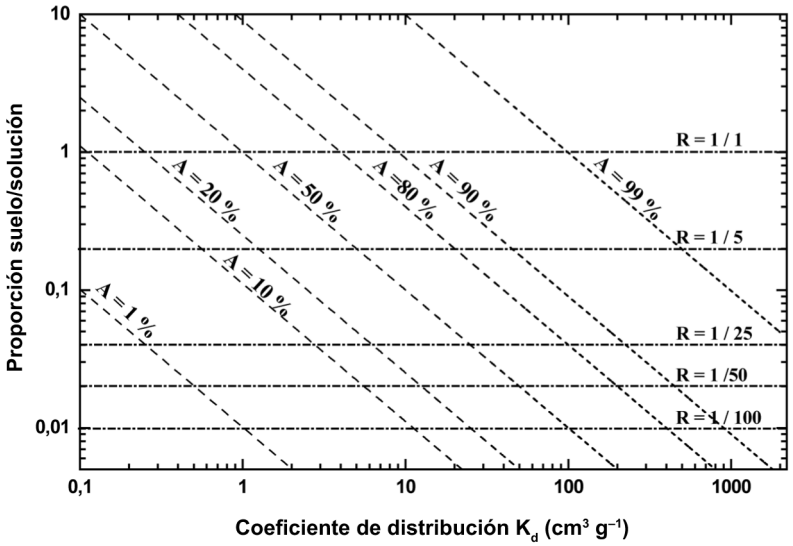


Figura 1. Relación entre las proporciones suelo/solución y K_d con diversos porcentajes de adsorción de la sustancia problema

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

La figura 1 muestra las proporciones suelo/solución necesarias en función de K_d para diversos niveles de adsorción. Por ejemplo, con una proporción suelo/solución de 1:5 y un K_d de 20, habrá aproximadamente un 80 % de adsorción. Para obtener una adsorción del 50 % con el mismo K_d, debe utilizarse una proporción de 1:25. Este planteamiento de la selección de las proporciones suelo/solución adecuadas da al investigador la flexibilidad suficiente para satisfacer sus necesidades experimentales.

Los casos que son más difíciles de tratar son aquellos en que la sustancia química se adsorbe mucho o muy poco. En los casos en que se dé adsorción baja, se recomienda una proporción suelo/solución de 1:1, aunque con algunos tipos de suelo muy orgánico pueden ser necesarias proporciones más pequeñas para obtener una mezcla fluida. Debe tenerse cuidado con la metodología analítica para medir pequeños cambios en la concentración de la solución; si no, la medida de la adsorción será inexacta. Por otra parte, en caso de coeficientes de distribución K_d muy altos, puede llegarse hasta una proporción suelo/solución de 1:100 para dejar una cantidad significativa de sustancia química en la solución. Sin embargo, debe tenerse cuidado para asegurar una buena mezcla, y dejarse tiempo suficiente para que el sistema se equilibre. Un planteamiento alternativo es predecir el valor de K_d aplicando técnicas de estimación basadas, por ejemplo, en los valores de P_{ow} (apéndice 3). Esto podría ser útil especialmente para las sustancias químicas poco adsorbidas/polares con $P_{ow} < 20$ y para las sustancias lipofílicas/de alta sorción con $P_{ow} > 10^4$.

1.9. REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

1.9.1. **Condiciones de la prueba**

Todos los experimentos se hacen a temperatura ambiente y, si es posible, a una temperatura constante situada entre 20 y 25 °C.

Las condiciones de la centrifugación permitirán eliminar de la solución las partículas de más de 0,2 μm. Este valor corresponde a la partícula más pequeña que se considera partícula sólida, y es el límite entre partículas sólidas y coloidales. En el apéndice 4 figuran orientaciones sobre cómo determinar las condiciones de la centrifugación.

Si el equipo de centrifugación no puede garantizar la eliminación de las partículas de más de 0,2 μm, puede utilizarse una combinación de centrifugación y de filtración con filtros de 0,2 μm. Estos filtros deben hacerse de un material inerte conveniente para evitar cualquier pérdida de la sustancia problema en ellos. En todo caso, debe demostrarse que no se produce durante la filtración ninguna pérdida de sustancia problema.

1.9.2. **Etapa 1: Estudio preliminar**

La finalidad de llevar a cabo un estudio preliminar figura ya en el punto 1.2 «Objeto». Con el experimento sugerido más adelante se dan orientaciones sobre la realización de tal prueba.

1.9.2.1. *Selección de las proporciones óptimas suelo/solución*

Se utilizan 2 tipos de suelo y 3 proporciones suelo/solución (6 experimentos). Un tipo de suelo tendrá alto contenido de carbono orgánico y bajo contenido de arcilla; el otro, bajo contenido de carbono orgánico y alto contenido de arcilla. Se sugieren las proporciones siguientes:

— 50 g de suelo y 50 cm^3 de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1:1),

▼B

— 10 g de suelo y 50 cm^3 de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1:5),

— 2 g de suelo y 50 cm^3 de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1:25).

La cantidad mínima de suelo con la cual puede llevarse a cabo el experimento depende de las instalaciones del laboratorio y de las características de los métodos analíticos utilizados. Sin embargo, se recomienda utilizar por lo menos 1 g, y preferiblemente 2 g, para obtener resultados fiables en la prueba.

Una muestra de control con solamente la sustancia problema en solución de $CaCl_2$ 0,01 M (sin suelo) se somete precisamente al mismo tratamiento que los sistemas de prueba, para comprobar la estabilidad de la sustancia problema en solución de $CaCl_2$ y su posible adsorción a las superficies de los recipientes del ensayo.

Una muestra en blanco por suelo con la misma cantidad de suelo y el volumen total de 50 cm^3 de solución de $CaCl_2$ 0,01 M (sin sustancia problema) se somete al mismo procedimiento de prueba, con el fin de servir de contraste durante el análisis para detectar sustancias de interferencia o suelos contaminados.

Todos los experimentos, incluidos los controles y los blancos, deben llevarse a cabo al menos por duplicado. El número total de muestras que deben prepararse para el estudio puede calcularse en función de la metodología seguida.

Los métodos para el estudio preliminar y el estudio principal son generalmente los mismos; se mencionan las excepciones en su caso.

Las muestras de suelo secadas al aire se equilibran agitándolas con un volumen mínimo de 45 cm^3 de $CaCl_2$ 0,01 M durante una noche (12 horas) antes del día del experimento. Después se añade cierto volumen de la solución madre de sustancia problema para ajustar el volumen final a 50 cm^3. Este volumen añadido de la solución madre: a) no debe exceder del 10 % del volumen final de 50 cm^3 de la fase acuosa para cambiar lo menos posible la naturaleza de la solución de preequilibrado, y b) debe suponer preferiblemente una concentración inicial de la sustancia problema en contacto con el suelo (C_o) por lo menos dos órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico; este umbral garantiza la posibilidad de llevar a cabo medidas exactas incluso en caso de adsorción fuerte (> 90 %) y de determinar más tarde las isotermas de adsorción. También se recomienda que, a ser posible, la concentración inicial de sustancia (C_o) no supere la mitad de su límite de solubilidad.

Se da más abajo un ejemplo de cómo calcular la concentración de la solución madre (C_{st}). Se supone un límite de detección de 0,01 $\mu g\ cm^{-3}$ y una adsorción del 90 %; así pues, la concentración inicial de la sustancia problema en contacto con el suelo debe ser preferiblemente 1 $\mu g\ cm^{-3}$ (dos órdenes de magnitud más alta que el límite de detección). Suponiendo que se añade el volumen recomendado máximo de la solución madre (es decir, 5 cm^3 a 45 cm^3 de solución de equilibrado de $CaCl_2$ 0,01 M (= el 10 % de la solución madre hasta un volumen total de 50 cm^3 de fase acuosa), la concentración de la solución madre debe ser 10 $\mu g\ cm^{-3}$, que es tres órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico.

El pH de la fase acuosa debe medirse antes y después del contacto con el suelo, puesto que desempeña un papel importante en todo el proceso de adsorción, especialmente en caso de sustancias ionizables.

▼B

Se agita la mezcla hasta que se alcance el equilibrio de adsorción. El tiempo de equilibrado de los suelos es muy variable, dependiendo de la sustancia química y del suelo; generalmente es suficiente un período de 24 horas (77). En el estudio preliminar pueden recogerse muestras secuencialmente durante un período de 48 horas desde la mezcla (por ejemplo, a las 4, 8, 24, 48 horas). Sin embargo, los tiempos de análisis deben considerarse con flexibilidad para tener en cuenta el horario de trabajo del laboratorio.

Hay dos opciones para el análisis de la sustancia problema en la solución acuosa: a) el método paralelo, y b) el método en serie. Debe insistirse en que, aunque el método paralelo sea experimentalmente más pesado, el tratamiento matemático de los resultados es más simple (apéndice 5). Sin embargo, la elección de la metodología seguida corresponde al experimentador, que habrá de considerar las instalaciones y los recursos disponibles del laboratorio.

a) Método paralelo: se preparan tantas muestras con la misma proporción de suelo/solución como intervalos de tiempo a que se desee estudiar la cinética de adsorción. Después de la centrifugación y, en su caso, filtración, la fase acuosa del primer tubo se recupera lo más completamente posible y se analiza después de, por ejemplo, 4 horas, la del segundo tubo después de 8 horas, la del tercero después de 24, etc.

b) Método en serie: se prepara solamente una muestra por duplicado de cada proporción suelo/solución. A los intervalos de tiempo definidos se centrifuga la mezcla para separar las fases. Se determina inmediatamente la sustancia problema en una pequeña alícuota de la fase acuosa: el experimento continúa con la mezcla original. Si se aplica la filtración después de la centrifugación, el laboratorio debe tener instalaciones para realizar la filtración de pequeñas alícuotas acuosas. Se recomienda que el volumen total de las alícuotas tomadas no exceda del 1 % del volumen total de la solución, para no cambiar mucho la proporción suelo/solución ni disminuir la masa de soluto disponible para la adsorción durante la prueba.

La adsorción porcentual se calcula a cada tiempo A_{t_i} en función de la concentración inicial nominal y de la concentración medida a ese tiempo de muestreo (t_i), corregido para tener en cuenta el valor del blanco. Se realizan las gráficas de A_{t_i} frente al tiempo (figura 1 del apéndice 5) para estimar la llegada a la meseta de equilibrio ([1]). También se calcula el valor de K_d en el equilibrio. Tomando como base este valor de K_d, a partir de la figura 1 se seleccionan proporciones adecuadas suelo/solución, de modo que la adsorción porcentual alcance más del 20 % y, preferiblemente, > 50 % (61). Todas las ecuaciones y principios de gráficas aplicables figuran en el punto 2, de «Datos e informes», y en el apéndice 5.

1.9.2.2. *Determinación del tiempo de equilibrado de adsorción y de la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio*

Como ya se ha mencionado, las gráficas de A_{t_i} o C_{aq}^{ads} frente al tiempo permiten la estimación del logro del equilibrio de adsorción y de la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio. Las figuras 1 y 2 del apéndice 5 muestran ejemplos de tales gráficas. El tiempo de equilibrado es el que necesita el sistema para alcanzar una meseta.

([1]) También pueden utilizarse gráficas de la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa C_{aq}^{ads} frente al tiempo para estimar la llegada a la meseta de equilibrio (véase la figura 2 del apéndice 5).

▼B

Si, con un suelo determinado, no se llega a ninguna meseta sino que hay un aumento constante, puede deberse a la complicación por factores tales como la biodegradación o la difusión lenta. La biodegradación puede comprobarse repitiendo el experimento con una muestra esterilizada del suelo. Si no se logra ninguna meseta incluso en este caso, el experimentador debe realizar estudios específicos para buscar otros fenómenos que pudieran darse: puede hacerse con modificaciones apropiadas de las condiciones del experimento (temperatura, tiempos de agitación, proporciones suelo/solución). Corresponde al experimentador decidir si continúa con el procedimiento de prueba a pesar de que posiblemente no se llegue a lograr el equilibrio.

1.9.2.3. *Adsorción en la superficie del recipiente del ensayo y estabilidad de la sustancia problema*

Analizando las muestras de control puede obtenerse información sobre la adsorción de la sustancia problema en la superficie de los recipientes del ensayo, así como sobre su estabilidad. Si se observa una disminución superior al error típico del método analítico, puede haber fenómenos de degradación abiótica o adsorción en la superficie del recipiente del ensayo. Puede conseguirse distinguir entre estos dos fenómenos lavando a fondo las paredes del recipiente con un volumen conocido de un solvente apropiado y determinando la sustancia problema en la solución de lavado. Si no se observa ninguna adsorción en la superficie de los recipientes del ensayo, la disminución confirma la inestabilidad abiótica de la sustancia problema. Si se encuentra adsorción, es necesario cambiar el material de los recipientes del ensayo. Sin embargo, los datos sobre la adsorción en la superficie de los recipientes del ensayo obtenidos de este experimento no pueden extrapolarse directamente al experimento con suelo/solución. La presencia de suelo afecta a esta adsorción.

Puede obtenerse información adicional sobre la estabilidad de la sustancia problema mediante la determinación del balance de masa parental a lo largo del tiempo. Esto significa que se determina la sustancia problema en la fase acuosa, en los extractos de suelo y en las paredes del recipiente del ensayo. La diferencia entre la masa de la sustancia problema añadida y la suma de las masas de la sustancia problema en la fase acuosa, extractos de suelo y paredes de los recipientes del ensayo es igual a la masa degradada, volatilizada o no extraída. Para llevar a cabo una determinación del balance de masa, debe haberse alcanzado el equilibrio de adsorción en el tiempo que dure el experimento.

El balance de masa se lleva a cabo en ambos suelos y con una proporción suelo/solución por suelo que dé una disminución por encima del 20 % (preferiblemente > 50 %) en el equilibrio. Cuando se termine el experimento de selección de la proporción con el análisis de la última muestra de la fase acuosa después de 48 horas, las fases se separan por centrifugación y, si se desea, filtración. Se recupera lo más posible de la fase acuosa, y se añade al suelo un solvente de extracción conveniente (coeficiente de extracción de por lo menos el 95 %) para extraer la sustancia problema. Se recomienda hacer por lo menos dos extracciones sucesivas. Se determina la cantidad de sustancia problema presente en los extractos de recipientes del ensayo y del suelo, y se calcula el balance de masa (ecuación 10 en el punto 2.1.2). Si es inferior al 90 %, se considera que la sustancia problema es inestable en la escala de tiempo de la prueba. Sin embargo, los estudios podían aún continuar, teniendo en cuenta la inestabilidad de la sustancia problema; en este caso se recomienda analizar ambas fases en el estudio principal.

▼B

1.9.3. *Etapa 2: Cinética de adsorción con una concentración de la sustancia problema*

Se utilizan 5 suelos, seleccionados a partir del cuadro 1. Es conveniente la inclusión entre estos 5 suelos de algunos o de todos los suelos utilizados en el estudio preliminar, si procede. En tal caso, la etapa 2 no tiene que repetirse con los suelos utilizados en el estudio preliminar.

El tiempo de equilibrado, la proporción suelo/solución, el peso de la muestra de suelo, el volumen de la fase acuosa en contacto con el suelo y la concentración de la sustancia problema en la solución se seleccionan basándose en los resultados del estudio preliminar. Es mejor hacer el análisis aproximadamente después de un tiempo del contacto de 2, 4, 6, 8 (quizás también 10) y 24 horas; el tiempo de agitación puede ampliarse a un máximo de 48 horas en caso de que una sustancia requiera un tiempo más largo de equilibrado según los resultados de la selección de la proporción. Sin embargo, los tiempos de análisis pueden considerarse con flexibilidad.

Se hace cada experimento (un suelo y una solución) al menos por duplicado para poder estimar la varianza de los resultados. En cada experimento se lleva a cabo una prueba en blanco, con suelo y solución de $CaCl_2$ 0,01 M, sin sustancia problema, y con un peso y un volumen, respectivamente, idénticos a los del experimento. Se somete al mismo procedimiento de prueba una muestra de control con solamente la sustancia problema en solución de $CaCl_2$ 0,01 M (sin suelo) como precaución frente a fenómenos inesperados.

La adsorción porcentual se calcula a cada tiempo A_{t_i} o intervalo de tiempo $A_{\Delta t_i}$ (según sea necesario) y se representa gráficamente frente al tiempo. También se calcula el coeficiente de distribución K_d en el equilibrio, así como el coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico K_{oc} (con sustancias orgánicas no polares).

Resultados de la prueba de cinética de adsorción

El valor lineal de K_d es generalmente exacto para describir el comportamiento respecto a la sorción en el suelo (35) (78) y refleja la movilidad inherente de las sustancias químicas en el suelo. Por ejemplo, en general, las sustancias con $K_d < 1$ cm^3 g^{-1} se consideran cualitativamente móviles. Del mismo modo, MacCall *et al.* (16) han elaborado un sistema de clasificación de la movilidad basado en valores de K_{oc} (16). Además, hay sistemas de clasificación de la lixiviación basados en la relación entre K_{oc} y DT-50 ([1]) (32) (79).

También, según estudios de análisis de error (61), los valores de K_d inferiores a 0,3 cm^3 g^{-1} no pueden estimarse exactamente a partir de una disminución de la concentración en la fase acuosa, incluso cuando se aplica la proporción más favorable suelo/solución (desde el punto de vista de la exactitud), es decir, 1:1. En este caso se recomienda el análisis de ambas fases, suelo y solución.

([1]) DT-50: tiempo necesario para la degradación del 50 % de la sustancia problema.

▼B

En cuanto a las observaciones mencionadas, se recomienda que el estudio del comportamiento de la adsorción de una sustancia química en el suelo y de su movilidad potencial continúe mediante la determinación de las isotermas de adsorción de Freundlich para los sistemas de los cuales sea posible una determinación exacta de K_d con el protocolo experimental seguido en este método de ensayo. La determinación exacta es posible si el valor que resulta de multiplicar K_d por la proporción suelo/solución es >, cuando las medidas se basan en la disminución de la concentración de la fase acuosa (método indirecto), o bien >, cuando se analizan ambas fases (método directo) (61).

1.9.4. *Etapa 3: Isotermas de adsorción y cinética de desorción/isotermas de desorción*

1.9.4.1. Isotermas de adsorción

Se utilizan 5 concentraciones de sustancia problema que cubran preferiblemente dos órdenes de magnitud; en la selección de estas concentraciones deben tenerse en cuenta la hidrosolubilidad y las concentraciones acuosas resultantes en el equilibrio. Debe mantenerse la misma proporción suelo/solución por suelo a lo largo del estudio. La prueba de adsorción se lleva a cabo según lo descrito anteriormente, con la única diferencia de que la fase acuosa se analiza solamente una vez, al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio según lo determinado antes en la etapa 2. Se determinan las concentraciones de equilibrio en la solución y se calcula la cantidad adsorbida a partir de la disminución de la sustancia problema en la solución o con el método directo. La masa adsorbida por unidad de masa del suelo se representa gráficamente en función de la concentración de la sustancia problema en el equilibrio (véase el punto 2, «Datos e informes»).

Resultados del experimento de isotermas de adsorción

Entre los modelos matemáticos de adsorción propuestos hasta ahora, el de las isotermas de Freundlich es el utilizado más frecuentemente para describir procesos de adsorción. En las referencias (41) (45) (80) (81) (82) se proporciona información más detallada sobre la interpretación e importancia de los modelos de adsorción.

Nota: Debe indicarse que es posible comparar los valores de K_F (coeficiente de adsorción de Freundlich) de diferentes sustancias solamente si estos valores de K_F se expresan en las mismas unidades (83).

1.9.4.2. Cinética de desorción

El propósito de este experimento es investigar si una sustancia química se adsorbe reversible o irreversiblemente a un suelo. Esta información es importante, puesto que el proceso de desorción también desempeña un papel destacado en el comportamiento de las sustancias en el suelo de campo. Por otra parte, los datos de desorción son útiles para la modelización por ordenador de la lixiviación y la simulación del arrastre de sustancias disueltas. Si se desea hacer un estudio de desorción, se recomienda que el estudio descrito a continuación se lleve a cabo con cada sistema para el cual haya sido posible una determinación exacta de K_d en el experimento anterior de cinética de adsorción.

Análogamente al estudio de cinética de adsorción, hay dos opciones para proceder con el experimento de cinética de desorción: a) el método paralelo, y b) el método en serie. La selección de la metodología seguida corresponde al experimentador, que tendrá en cuenta las instalaciones y los recursos del laboratorio.

▼B

a) Método paralelo: de cada suelo seleccionado para realizar el estudio de desorción se preparan tantas muestras con la misma proporción suelo/solución como intervalos de tiempo a que se desee estudiar la cinética de desorción. Es preferible utilizar los mismos intervalos de tiempo que en el experimento de cinética de adsorción: sin embargo, el tiempo total puede ampliarse según sea necesario para que el sistema alcance el equilibrio de desorción. En cada experimento (un suelo, una solución) se lleva a cabo una prueba en blanco, con suelo y solución de $CaCl_2$ 0,01 M, sin la sustancia problema, y con un peso y un volumen, respectivamente, idénticos a los del experimento. Como muestra de control, la sustancia problema en solución de $CaCl_2$ 0,01 M (sin suelo) se somete al mismo procedimiento de prueba. Todas las mezclas del suelo con la solución se agitan basta que se alcance el equilibrio de adsorción (según lo determinado antes en la etapa 2). Entonces, las fases se separan por centrifugación y las fases acuosas se retiran en la mayor proporción posible. El volumen de solución retirado se sustituye con un volumen igual de $CaCl_2$ 0,01 M sin sustancia problema y las nuevas mezclas se agitan otra vez. La fase acuosa del primer tubo se recupera lo más completamente posible y se analiza después de, por ejemplo, 2 horas, la del segundo tubo después de 4 horas, la del tercero después de 6 horas, etc., hasta que se alcance el equilibrio de desorción.

b) Método en serie: después del experimento de cinética de adsorción, se centrifuga la mezcla y se retira lo más posible la fase acuosa. El volumen de solución retirado se sustituye con un volumen igual de $CaCl_2$ 0,01 M sin sustancia problema. La nueva mezcla se agita hasta que se alcance el equilibrio de desorción. Durante este período, a intervalos de tiempo definidos, se centrifuga la mezcla para separar las fases. En una pequeña alícuota de la fase acuosa se determina inmediatamente la sustancia problema; el experimento continúa después con la mezcla original. El volumen de cada alícuota debe ser menos del 1 % del volumen total. Se añade a la mezcla la misma cantidad de solución de $CaCl_2$ 0,01 M para mantener la proporción suelo/solución, y continúa la agitación hasta el intervalo siguiente.

La desorción porcentual se calcula a cada tiempo (D_{t_i}) o intervalo de tiempo ($D_{\Delta t_i}$) (según las necesidades del estudio) y se representa frente al tiempo. También se calcula el coeficiente de desorción K_{des} en el equilibrio. Todas las ecuaciones aplicables figuran en el punto 2, «Datos e informes», y en el apéndice 5.

Resultados del experimento de cinética de desorción

Las gráficas comunes de la desorción D_{t_i} y la adsorción A_{t_i} porcentuales frente al tiempo permiten valorar la reversibilidad del proceso de adsorción. Si el equilibrio de desorción se logra incluso dentro del doble del tiempo de equilibrio de adsorción, y la desorción total es de más del 75 % de la cantidad adsorbida, se considera que la adsorción es reversible.

1.9.4.3. Isotermas de desorción

Las isotermas de desorción de Freundlich se determinan con los suelos utilizados en el experimento de las isotermas de adsorción. La prueba de desorción se lleva a cabo según lo descrito en el punto 1.9.2.5.2, «Cinética de desorción», con la única diferencia de que la fase acuosa se analiza solamente una vez, en el equilibrio de desorción. Se calcula la cantidad de sustancia problema desorbida. El contenido de sustancia problema que permanece adsorbida al suelo en el equilibrio de desorción se representa en función de la concentración de equilibrio de la sustancia problema en la solución (véase a continuación «Datos e informes» y el apéndice 5).

▼B

2. **DATOS E INFORMES**

Los datos analíticos se presentan en forma de cuadro (véase el apéndice 6). Se dan las medidas y las medias calculadas. Se proporcionan las representaciones gráficas de las isotermas de adsorción. Se hacen los cálculos según lo descrito más adelante.

Para la prueba, se considera que el peso de 1 cm^3 de solución acuosa es 1 g. La proporción suelo/solución puede expresarse en unidades de peso/peso o de peso/volumen con la misma cifra.

2.1. ADSORCIÓN

La adsorción A_{t_i} se define como el porcentaje de sustancia adsorbida en el suelo en relación con la cantidad presente al principio de la prueba, en las condiciones de prueba. Si la sustancia problema es estable y no se adsorbe significativamente a la pared del recipiente, A_{t_i} se calcula a cada tiempo t_i, según la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \qquad (3)$$

donde:

A_{t_i} = adsorción porcentual al tiempo t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo al tiempo t_i (μg),

m_0 = masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al principio de la prueba (μg).

En el apéndice 5 figura información detallada sobre el cálculo de la adsorción porcentual A_{t_i} con los métodos paralelo y en serie.

El coeficiente de distribución K_d es la proporción entre el contenido de sustancia en la fase edáfica y la concentración en masa de la sustancia en la solución acuosa, en las condiciones de prueba, cuando se alcanza el equilibrio de adsorción:

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

donde:

$C_s^{ads}(eq)$ = contenido de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (μg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de adsorción (μg cm^{-3}); esta concentración se determina analíticamente teniendo en cuenta los valores obtenidos en las pruebas en blanco,

$m_s^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción (μg),

m_{soil} = cantidad de la fase edáfica, expresada en masa seca de suelo (g),

V_o = volumen inicial de la fase acuosa en contacto con el suelo (cm^3).

La relación entre A_{eq} y K_d se da en la ecuación siguiente:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

donde:

A_{eq} = adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción (%).

El coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico K_{oc} relaciona el coeficiente de distribución K_d con el contenido de carbono orgánico de la muestra de suelo:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (6)$$

donde:

% OC = porcentaje de carbono orgánico en la muestra de suelo ($g\ g^{-1}$).

El coeficiente K_{oc} representa un solo valor que caracteriza el reparto principalmente de las sustancias orgánicas no polares entre el carbono orgánico del suelo o sedimento y el agua. La adsorción de estas sustancias está correlacionada con el contenido orgánico del sólido de sorción (7): así pues, los valores de K_{oc} dependen de las características específicas de las fracciones húmicas que difieren considerablemente en su capacidad de sorción, debido a diferencias de origen, génesis, etc.

2.1.1. **Isotermas de adsorción**

La ecuación de las isotermas de adsorción de Freundlich relaciona la cantidad de sustancia problema adsorbida con la concentración de sustancia problema en la solución en el equilibrio (ecuación 8).

Los datos se tratan como en el punto 2.1, «Adsorción», y, de cada tubo de ensayo, se calcula el contenido de sustancia problema adsorbida en el suelo después de la prueba de adsorción [$C_s^{ads}(eq)$, en otras partes expresado como x/m]. Se acepta que se ha logrado el equilibrio y que $C_s^{ads}(eq)$ representa el valor de equilibrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} \ (\mu g\ g^{-1}) \qquad (7)$$

La ecuación de adsorción de Freundlich es la siguiente (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \qquad (8)$$

o, en forma lineal:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \qquad (9)$$

donde:

K_F^{ads} = coeficiente de adsorción de Freundlich: su dimensión es $cm^3\ g^{-1}$ solo si l/n = 1; en los demás casos, se introduce la pendiente 1/n en la dimensión ce K_F^{ads} ($\mu g^{1-l/n}\ (cm^3)^{l/n}\ g^{-1}$)

n = constante de regresión: l/n generalmente oscila entre 0,7 y 1,0, indicando que los datos de sorción suelen ser ligeramente no lineales.

Se representan gráficamente las ecuaciones (8) y (9) y se calculan los valores de K_F^{ads} y 1/n por análisis de regresión utilizando la ecuación 9. También se calcula el coeficiente de correlación r^2 de la ecuación logarítmica. En la figura 2 se da un ejemplo de tales representaciones:

▼B

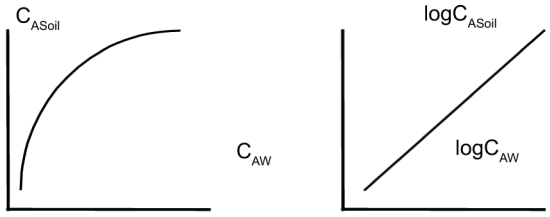


Figura 2. Representación de la adsorción de Freundlich, normal y linealizada

2.1.2. **Balance de masa**

El balance de masa (MB) se define como el porcentaje de sustancia que puede recuperarse analíticamente después de una prueba de adsorción respecto a la cantidad nominal de sustancia presente al principio de la prueba.

El tratamiento de los datos será diferente si el solvente es completamente miscible con agua. En caso de un solvente miscible con agua, el tratamiento de los datos descrito en el punto 2.2, «Desorción» puede aplicarse para determinar la cantidad de sustancia recuperada por la extracción con el solvente. Si el solvente es menos miscible con agua, hay que hacer la determinación de la cantidad recuperada.

El balance de masa MB de la adsorción se calcula del siguiente modo; se supone que el término m_E corresponde a la suma de las masas de la sustancia problema extraídas del suelo y de la superficie del recipiente del ensayo con un solvente orgánico:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

donde:

MB = balance de masa (%)

m_E = masa total de la sustancia problema extraída del suelo y de las paredes del recipiente del ensayo en dos fases (μg),

C_o = concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo (μg cm^{-3}),

V_{rec} = volumen de sobrenadante recuperado después del equilibrio de adsorción (cm^{-3}).

2.2. DESORCIÓN

La desorción (D) se define como el porcentaje de sustancia problema que se desorbe, en relación con la cantidad de sustancia adsorbida previamente, en las condiciones de prueba:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

donde:

D_{t_i} = desorción porcentual a un tiempo t_i (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masa de la sustancia problema desorbida del suelo a un tiempo t_i (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (μg).

En el apéndice 5 figura información detallada sobre cómo calcular la desorción porcentual D_{t_i} con los métodos paralelo y en serie.

El coeficiente de desorción aparente (K_{des}) es, en las condiciones de prueba, la proporción entre el contenido de sustancia que permanece en la fase edáfica y la concentración en masa de la sustancia desorbida en la solución acuosa, cuando se alcanza el equilibrio de desorción:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (12)$$

donde:

K_{des} = coeficiente de desorción ($cm^3\ g^{-1}$),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masa total de la sustancia problema desorbida del suelo en el equilibrio de desorción (μg),

V_T = volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante la prueba de cinética de desorción (cm^3).

En el apéndice 5, en la sección «Desorción», figuran directrices para calculan $m_{aq}^{des}(eq)$

Observación

Si la prueba de adsorción precedente se ha llevado a cabo con el método paralelo, se considera que el volumen V_T de la ecuación 12 es igual a V_o.

2.2.1. **Isotermas de desorción**

La ecuación de isotermas de desorción de Freundlich relaciona el contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo con la concentración de la sustancia problema en la solución en el equilibrio de desorción (ecuación 16).

Para cada tubo de prueba, el contenido de sustancia que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción se calcula del modo siguiente:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \ (\mu g\ g^{-1}) \qquad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ se define como:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \qquad (14)$$

donde:

$C_s^{des}(eq)$ = contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción ($\mu g\ g^{-1}$),

$m_m^{des}(eq)$ = masa de la sustancia determinada analíticamente en la fase acuosa en el equilibrio de desorción (μg),

▼B

m_{aq}^{A} = masa de la sustancia problema que queda en solución después de alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volumen de solución tomada del tubo para la medida de la sustancia problema, en el equilibrio de desorción (cm^3),

V_R = volumen del sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3).

A continuación se muestra la ecuación de desorción de Freundlich:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

o, en forma lineal:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

donde:

K_F^{des} = coeficiente de desorción de Freundlich,

n = constante de regresión,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentración en masa en la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de desorción (μg cm^{-3}).

Las ecuaciones 16 y 17 pueden representarse gráficamente y el valor de K_F^{des} y el de 1/n se calculan por análisis de regresión utilizando la ecuación 17.

Observación

Si el exponente l/n de adsorción o desorción de Freundlich es igual a 1, la constante de enlace de adsorción o desorción de Freundlich (K_F^{ads} y K_F^{des}) será respectivamente igual a la constante de equilibrio de adsorción o desorción (K_d y K_{des}), y las gráficas de C_s frente a C_{aq} serán lineales. Si los exponentes no son iguales a 1, las gráficas de C_s frente a C_{aq} no serán lineales y las constantes de adsorción y desorción variarán a lo largo de las isotermas.

2.2.2. **Informe de la prueba**

El informe de la prueba debe incluir la información siguiente:

— identificación completa de las muestras de suelo utilizadas, incluyendo:

— referencia geográfica del sitio (latitud, longitud),

— fecha del muestreo,

▼B

— tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.),

— profundidad del muestreo,

— contenido de arena/limo/arcilla,

— valores de pH (en $CaCl_2$ 0,01 M),

— contenido de carbono orgánico,

— contenido de materia orgánica,

— contenido de nitrógeno,

— proporción C/N,

— capacidad de intercambio canónico (mmol/kg),

— toda la información relativa a la recogida y conservación de las muestras de suelo,

— en su caso, toda información pertinente para la interpretación de la adsorción/desorción de la sustancia problema,

— referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro;

— información sobre la sustancia problema según el caso;

— temperatura de los experimentos;

— condiciones de centrifugación;

— procedimiento analítico utilizado para analizar la sustancia problema;

— justificación del uso eventual de agentes de solubilización para la preparación de la solución madre de la sustancia problema;

— explicación de las correcciones hechas en los cálculos, en su caso;

— datos según las fichas (apéndice 6) y representaciones gráficas;

— toda la información y observaciones útiles para la interpretación de los resultados de la prueba.

3. **REFERENCIAS**

(1) Kukowski H. and Brummer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L, (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N., Chemistry; Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting. 540/09-SS-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances. OPPTS Harmonized Test Guidelines. Series 835-Fate, Transpon and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 71 2-C-96-048. April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticidas in soils', in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, París, (Review).

(13) Calvet R., (1980) 'Adsorption-Desorption Phenomena' in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L. (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), 'An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media'. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A. Swann R.I., and Dishburger H.J., (1981), 'Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis', in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), 'Movement and sorption of chemicals applied to the soil'. Weeds, 13, 185-190.

(18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) 'Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils'. J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), 'Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil' in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.R., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), 'Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', IUPAC Reports on Pesticidas (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), 'Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils'. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Fd Agric, 18, 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981). 'Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(aikylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption'. Pestic. Sci. 12, 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). 'Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides'. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.

(25) Osgerby J.M., (1973), 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, 247-258.

(26) Guth J.A., (1972), 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlm-Dahlem, Heft 37, 143-154.

(27) Hamaker J.W., 1975), The interpretation of soil leaching experiments', in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Flaque and V.H. freed). pp. 1 3 5-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971). 'Pesticide mobility in soils'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, 732-210.

(29) Hamaker J.W., (1972), 'Diffusion and volatilization' in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system'. Pestic. Sci. 12, 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989), 'Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability'. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4). 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils'. J. of Soil Sci., 28, 340-350.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M. (1980), 'Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation producís in fallow soils'. Pest. Sci., 11, 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), 'Sorption estimates for modeling', in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S.M., (1967), 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), 'An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils'. J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), 'Molecular structure of herbicides and their sorption by soils'. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). 'Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), 'Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology'. J. Agrie. Food Chem., 32, 243-246.

(41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), 'Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil'. Residue Rev., 32, 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg. (1968), 'Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981) 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. Chemosphere 10, 83 3-846.

(44) Paya-Pérez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), 'Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners'. Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M, (1972). 'Adsorption in organic cbemicals' in Organic Chemicals ir. the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York. NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, 'Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils'. Weed Sci. 19:67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M, and Santelmann, (1975), 'Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils'. Weed Science, Vol. 23, 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) 'Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations' in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J. (1980), 'Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase', CREAMS. in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosión from Agricultural Management Systems, Chapter 19. Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspeets; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F. and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F., Enke Verlag. Stuttgart (1982), 11 th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, 353-354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system'. Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106» Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Bmssels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments»). Environ.Qual., 10(3), 382-386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons'. Chemosphere, 16(1), 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, 831-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981). 'Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption'. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), 8 3 3-846.

(73) Moreale A., van Bladel R.. (1981), 'Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité — reactivité. Revue de l'Agric. 34 (4), 319-322'.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere. 32(12), 2493-2504.

(75) Kördel \V., Kotthoff G.. Müller M. (1995), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test'. Chemosphere 30 (7), 1373-1 3S4.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases'. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), 'The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides'. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.C., and Harper S S., (1990), 'The retention processes: mechanisms' in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), 'Interpretation and use of sorption isotherms' in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), 'Studies in adsorption: XI, A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils'. J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M, and Arvien J.C., (1980), 'Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption'. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), 'Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

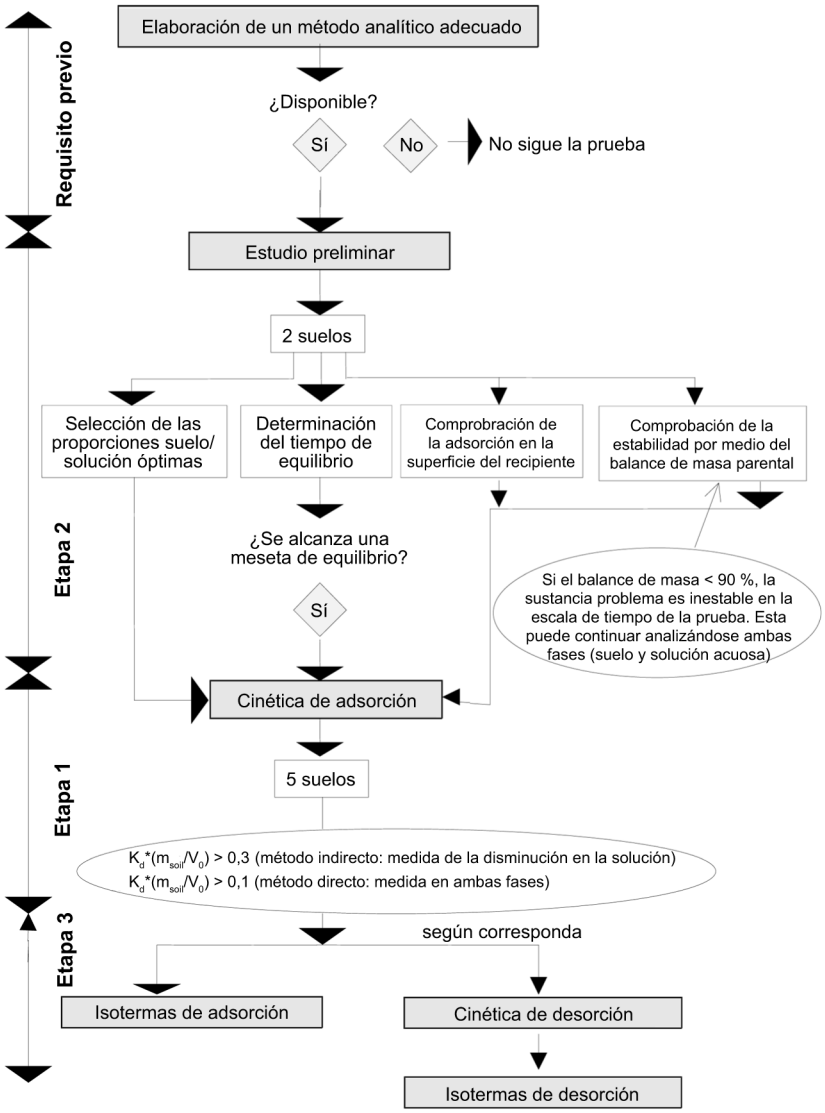
(84) Guth, J.A., (1985), 'Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 3 3, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Apéndice 1

Esquema de la prueba



▼B

Apéndice 2

INFLUENCIA DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO Y DEL CAMBIO DE CONCENTRACIÓN SOBRE LA EXACTITUD DE LOS RESULTADOS DE LA ADSORCIÓN

A partir del cuadro siguiente (84), se ve que, cuando la diferencia entre la masa inicial (m_0 = 110 µg) y la masa en el equilibrio [$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg] de la sustancia problema en la solución es muy pequeña, un error del 5 % en la medida de la concentración en el equilibrio origina un error del 50 % en el cálculo de la masa de la sustancia adsorbida en el suelo [$m_s^{ads}(eq)$] y del 52,4 % en el cálculo de K_d.

Cantidad de suelo m_{soil} = 10 g

Volumen de solución V_o = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)*$ (µg)	$C_s^{ads}(eq)*$ (µg g^{-1})	R^t	K_d*	R^t
	PARA A = 9 %							
m_0 = 110 µg o Co = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	Valor verd.	10	1,00	Valor verd.	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PARA A = 55 %							
m_0 = 110 µg o C_o = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	Valor verd.	60,0	6,00	Valor verd.	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PARA A = 99 %							
m_0 = 110 µg o Cn = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	Valor verd.	108,9	10,89	Valor verd.	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

donde:

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia problema en la fase edáfica en el equilibrio (µg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio (µg),

$C_s^{ads}(eq)$ = contenido de la sustancia problema en la fase edáfica en el equilibrio (µg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio (µg cm^{-3}),

R = error analítico en la determinación de $m_{aq}^{ads}(eq)$,

R: = error calculado debido al error analítico R.

▼B

Apéndice 3

TÉCNICAS DE ESTIMACIÓN DE K_d

1. Las técnicas de estimación permiten dar un valor de K_d a partir de correlaciones observadas con, por ejemplo, valores de P_{OW} (12) (39) (63) (64) (65) (66) (67) (68), datos de hidrosolubilidad (12) (19) (21) (39) (68) (69) (70) (71) (72) (73), o datos de polaridad obtenidos por aplicación de HPLC en fase inversa (74) (75) (76). Como se muestra en los cuadros 1 y 2, a partir de estas ecuaciones se calcula K_{oc} o K_{om} y después, indirectamente, se obtiene K_d con las ecuaciones:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%\ oc}\ (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%\ oc} (cm^3 g^{-1})$$

2. Estas correlaciones se basan en dos suposiciones: 1) la materia orgánica del suelo es el factor que más influye en la adsorción de una sustancia, y 2) las interacciones implicadas son principalmente no polares. En consecuencia, estas correlaciones: 1) no son aplicables a las sustancias polares (o solo lo son de forma limitada), y 2) no son aplicables a los casos en que el contenido de materia orgánica del suelo es muy pequeño (12). Por otra parte, aunque se han encontrado correlaciones satisfactorias entre P_{ow} y adsorción (19), no puede decirse lo mismo de la relación entre hidrosolubilidad y grado de adsorción (19) (21): en este sentido, los estudios son muy contradictorios.

3. En los cuadros 1 y 2 se dan ejemplos de correlaciones del coeficiente de adsorción con el coeficiente de reparto octanol-agua y con la hidrosolubilidad, respectivamente.

Cuadro 1

Ejemplos de correlaciones entre el coeficiente de distribución de la adsorción y el coeficiente de reparto octanol-agua; pueden verse más ejemplos en (12) (68)

Sustancias	Correlaciones	Autores
Ureas sustituidas	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromáticas cloradas	$\log K_{oc} - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Diversos plaguicidas	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl y Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarburos aromáticos	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles y Mantoura (1987) (67)

Cuadro 2

Ejemplos de correlaciones entre el coeficiente de distribución de la adsorción y la hidrosolubilidad; pueden verse más ejemplos en (68) (69)

Sustancias	Correlaciones	Autores
Diversos plaguicidas	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl y Mingelgrin (1984) (66)
Sustancias cloradas aromáticas, alifáticas	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
a-naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sustancias aromáticas alifáticas, cíclicas	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w$ $-0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Diversos compuestos	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Apéndice 4

CÁLCULOS PARA DEFINIR LAS CONDICIONES DE LA CENTRIFUGACIÓN

1. El tiempo de centrifugación viene dado por la siguiente fórmula, suponiendo partículas esféricas:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Con fines de simplificación, todos los parámetros se dan en unidades ajenas al SI (g, cm),

donde:

(i) = velocidad de giro (=2 Π rpm/60) (rad s^{-1}),

rpm = revoluciones por minuto,

η = viscosidad de la solución (g s^{-1} cm^{-1}),

r_p = radio de las partículas (cm),

p_s = densidad del suelo (g cm^{-3}),

ρ_{aq} = densidad de la solución (g cm^{-3}),

R_t = distancia desde el centro del rotor de centrifugación hasta el nivel de la solución en el tubo de centrífuga (cm),

R_b = distancia desde el centro del rotor de centrifugación hasta el fondo del tubo de centrífuga (cm),

R_b-R_t = longitud de la mezcla suelo/solución en el tubo de centrífuga (cm).

En la práctica general, se utiliza un tiempo doble del calculado para conseguir una separación completa.

2. La ecuación (1) puede simplificarse más si consideramos que la viscosidad (η) y la densidad (ρ_{aq}) de la solución son iguales a la viscosidad y la densidad del agua a 25 ºC: por tanto, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} and ρ_{aq} = 1,0 g, cm^{-3}.

Entonces, el tiempo de centrifugación se obtiene con la ecuación 2):

$$t = \frac{3,7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. En la ecuación 2 se ve que hay dos parámetros importantes para definir las condiciones de la centrifugación, es decir, el tiempo (t) y la velocidad (rpm) necesarios para conseguir la separación de las partículas de un tamaño determinado (en nuestro caso, de 0,1 μm de radio): 1) la densidad del suelo, y 2) la altura de la mezcla en el tubo de centrífuga (R_b-R_t), es decir, la distancia que recorre una partícula de suelo desde el nivel superior de la solución hasta el fondo del tubo: evidentemente, con un volumen determinado, la altura de la mezcla en el tubo dependerá del cuadrado del radio del tubo.

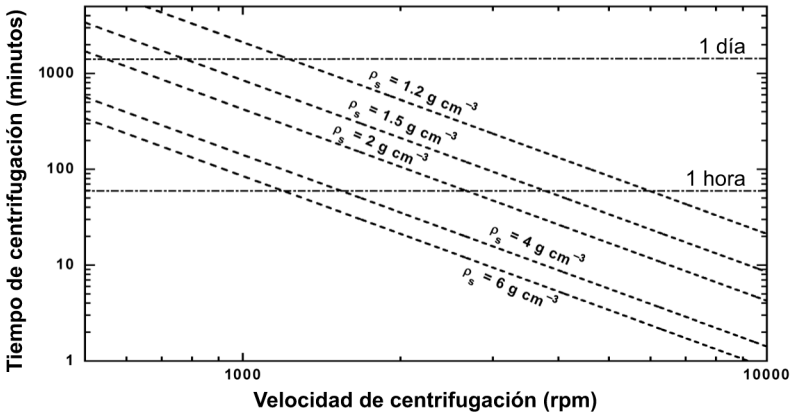
4. La figura 1 presenta las variaciones del tiempo de centrifugación (1) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes densidades de suelo (ρ_s) (figura 1a) y diferentes alturas de la mezcla en los tubos de centrífuga (figura 2a). En la figgura 1a queda de manifiesto la influencia de la densidad del suelo: por ejemplo, con una centrifugación clásica de 3 000 rpm el tiempo de centrifugación es de aproximadamente 240 minutos para una densidad de suelo de 1,2 g cm^{-3}, mientras que es de solo 50 minutos para 2,0 g cm^{-3}. Análogamente, según la figura 1b, con una centrifugación clásica de 3 000 rpm el tiempo de centrifugación es de aproximadamente 50 minutos para una altura de la mezcla de 10 cm y de solo 7 minutos para una altura de 1 cm. No obstante, es importante encontrar la relación óptima entre la centrifugación que requiera la menor altura posible y una manipulación fácil para el experimentador al separar las fases tras la centrifugación.

▼B

5. Por otra parte, al definir las condiciones experimentales para la separación de las fases suelo/solución, es importante considerar la posible existencia de una tercera «pseudofase», los coloides. Estas partículas, de tamaño inferior a 0,2 μm, pueden afectar considerablemente a todo el mecanismo de la adsorción de una sustancia en una suspensión de suelo. Cuando se realiza la centrifugación según se describe anteriormente, los coloides se quedan en la fase acuosa y se someten a análisis junto con la fase acuosa, con lo que se pierde la información sobre su influencia.

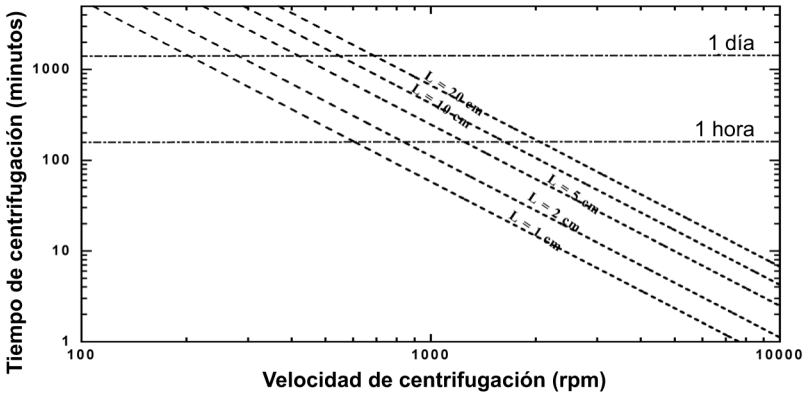
   Si el laboratorio donde se realiza la prueba tiene equipos de ultracentrifugación o ultrafiltración, es posible estudiar con mayor profundidad la adsorción/desorción de una sustancia en el suelo, con información sobre la adsorción de la sustancia en los coloides. En este caso, para separar las 3 fases (suelo, coloides, solución) debe realizarse una ultracentrifugación a 60 000 rpm/minuto o una ultrafiltración con una porosidad de 100 000 Dalton. También hay que modificar en consonancia el protocolo del ensayo, a fin de determinar la sustancia en las 3 fases.

Figura 1a.



Variaciones del tiempo de centrifugación (t) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes densidades de suelo (ρ_s). R_t = 10 cm; R_b-R_t = 10 cm; $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} and ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} at 25 ºC

Figura 1b.



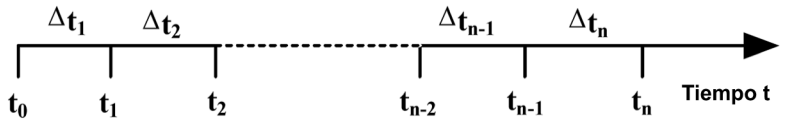
Variaciones del tiempo de centrifugación (t) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes alturas de la mezcla en el tubo de centrífuga (R_D-R_t) = L; R_t = 10 cm; $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1}; ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} a 25 ºC y ρ_5 = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Apéndice 5

CÁLCULO DE LA ADSORCIÓN A (%) Y DE LA DESORCIÓN D (%)

El esquema temporal del procedimiento es el siguiente:



A efectos de los cálculos, se supone que la sustancia problema es estable y no se adsorbe de forma importante a las paredes del recipiente.

ADSORCIÓN A (A%)

a) *Método paralelo*

La adsorción porcentual se calcula con cada tubo de ensayo (i) a cada tiempo (t_i), según la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Los términos de esta ecuación pueden calcularse de la forma siguiente:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i)\ V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

donde:

A_{t_i} = adsorción porcentual (%) al tiempo t_i,

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa de la sustancia problema en el suelo al tiempo t_i en que se realiza el análisis (μg),

m_0 = masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al inicio de la prueba (μg),

C_0 = concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo (μg cm^{-3}),

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa al tiempo t_i en que se realiza el análisis (µg cm^{-3}); esta concentración se determina analíticamente teniendo en cuenta los valores obtenidos en la prueba en blanco,

V_0 = volumen inicial de la solución problema en contacto con el suelo (cm^3).

Los valores de la adsorción porcentual A_{t_i} o $C_{aq}^{ads}(t_i)$ se representan gráficamente frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de sorción. En las figuras 1 y 2 se recogen ejemplos de tales gráficas.

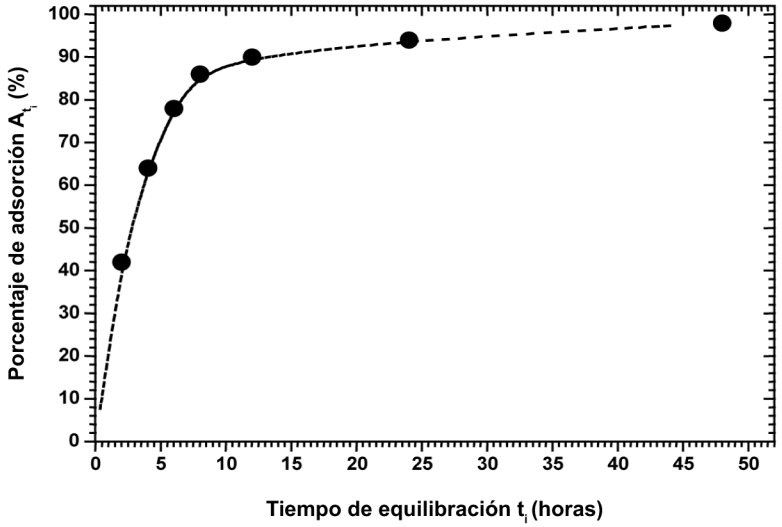


Figura 1.

Gráfica de equilibrio de adsorción

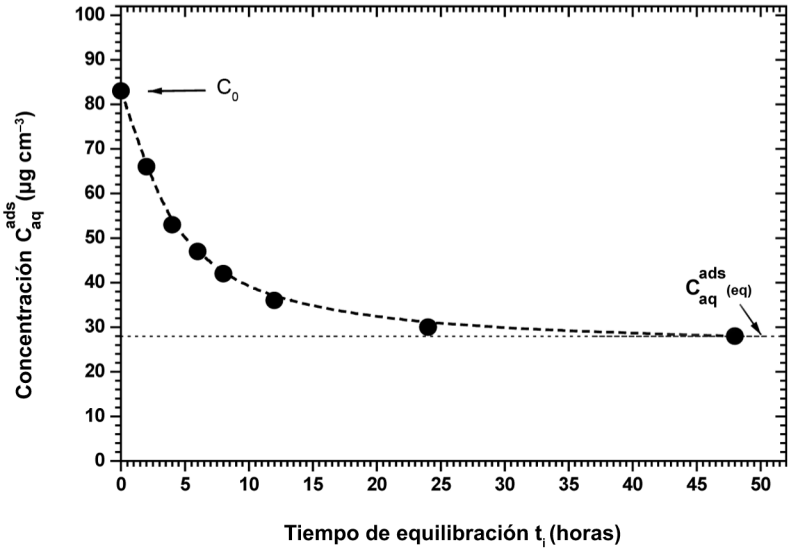


Figura. 2.

Concentración en masa dela sustancia problema en la dase acuosa (C_{aq}) frente al tiempo

▼B

b) *Método en serie*

Las siguientes ecuaciones tienen en cuenta que el procedimiento de adsorción se sigue con mediciones de la sustancia problema en pequeñas alícuotas de la fase acuosa a intervalos de tiempo especificados.

— Durante cada intervalo de tiempo, la cantidad de sustancia adsorbida en el suelo se calcula de la manera siguiente:

— para el primer intervalo de tiempo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— para el segundo intervalo de tiempo $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— para el tercer intervalo de tiempo $\Delta t3 = t3-t2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— para el enésimo intervalo de tiempo $\Delta tn = tn - tn\text{-}1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— El porcentaje de adsorción a cada intervalo de tiempo; $A_{\Delta t_i}$, se calcula con la ecuación siguiente:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

mientras que el porcentaje de adsorción A_{t_i} al tiempo t_i viene dado por la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Los valores de la adsorción A_{t_i} o $A_{\Delta t_i}$ (según las necesidades del estudio) se representan gráficamente frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de sorción.

— Al tiempo de equilibrado t_{eq}:

— la masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo es:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— la masa de la sustancia problema en la solución es:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— y la adsorción porcentual en el equilibrio es:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Los parámetros usados en estas ecuaciones se definen de la forma siguiente:

$m_s^{ads}(\Delta t_1),\ m_s^{ads}(\Delta t_2),\ ...,\ m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa de la sustancia adsorbida en el suelo durante los intervalos de tiempo Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} respectivamente (μg);

$m_m^{ads}(t_1),\ m_m^{ads}(t_2),\ ...,\ m_n{}^{ads}(t_n)$ = masa de la sustancia medida en una alícuota v v_a^A a los tiempos t_1, t_2,t_n respectivamente (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción (μg);

v_a^A = volumen de la alícuota donde se mide la sustancia problema (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = adsorción porcentual correspondiente al intervalo de tiempo Δt_i (%);

A_{eq} = adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción (%)

DESORCIÓN D (%)

El tiempo t_0 al que se inicia el experimento de cinética de desorción se considera que es el momento en que el volumen recuperado máximo de la solución de sustancia problema (después de alcanzarse el equilibrio de adsorción) es sustituido por un volumen igual de solución de $CaCl_2$ 0,01 M.

a) *Método paralelo*

A un tiempo t_i, la masa de la sustancia problema se mide en la fase acuosa tomada del tubo i $\left(V_r^i\right)$, y la masa desor-bida se calcula con arreglo a la ecuación siguiente:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

En el equilibrio de desorción $t_i = t_{eq}$ por lo que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

La masa de la sustancia problema desorbida durante un intervalo de tiempo (At_i) se da en la ecuación:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

La desorción porcentual se calcula:

— a un tiempo t_i a partir de la ecuación:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

— y durante un intervalo de tiempo (Δt_i) a partir de la ecuación:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

donde:

D_{t_i} = desorción porcentual al tiempo t_i (%),

$D_{\Delta t_i}$ = desorción porcentual correspondiente al intervalo de tiempo Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masa de la sustancia problema desorbida al tiempo t_i (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masa de la sustancia problema desorbida durante el intervalo de tiempo Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = masa de la sustancia problema medida analíticamente al tiempo t_i en un volumen de solución V_r^i, que se toma para el análisis (μg),

m_{aq}^{A} = masa de la sustancia problema que queda en solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen (μg).

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia problema en la solución en el equilibrio de adsorción (μg),

V_R = volumen de sobrenadante retirado del tubo después de que se haya alcanzado el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de una solución de $CaCl_2$ 0,01 M (cm

V_r^i = volumen de solución tomado del tubo (i) para la medida de la sustancia problema, en el experimento de cinética de desorción (cm^3).

Los valores de desorción D_i o $D_{\Delta t_i}$ (según las necesidades del estudio) se representan frente al tiempo t y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de desorción.

b) *Método en serie*

Las siguientes ecuaciones tienen en cuenta que el procedimiento de adsorción presentado se ha seguido con mediciones de la sustancia problema en pequeñas alícuotas ((v_a^A)) de la fase acuosa (método en serie en el punto 1.9, «Realización de la prueba»). Se supone que: a) el volumen de sobrenadante retirado del tubo tras el experimento de cinética de adsorción se ha sustituido con el mismo volumen de solución de $CaCl_2$ 0,01 M (V_R), y b) el volumen total de fase acuosa en contacto con el suelo (V_T) durante el experimento de cinética de desorción se mantiene constante y viene dado por la ecuación:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Al tiempo t_i:

— La masa de la sustancia problema se mide en una pequeña alícuota (v_a^D) y la masa desorbida se calcula con arreglo a la ecuación siguiente:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D \right)}{V_T} \right) \tag{19}$$

— Al equilibrio de desorción $t_i = t_{eq}$, por lo que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— La desorción porcentual D_{t_i} se calcula a partir de la ecuación siguiente:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

Al intervalo de tiempo (Δt_i):

Durante cada intervalo de tiempo, la cantidad de sustancia desorbida se calcula de la forma siguiente:

— para el primer intervalo de tiempo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— para el segundo intervalo de tiempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D \right)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D \right)}{V_T} \right)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2) \right] \tag{22}$$

— para el enésimo intervalo de tiempo $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D \right)}{V_T} \right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D \right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

Finalmente, la desorción porcentual a cada intervalo de tiempo, $D_{\Delta t_i}$, se calcula con la ecuación siguiente:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{24}$$

mientras que la desorción porcentual D_{t_i} al tiempo t_i viene dada por la ecuación:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{25}$$

▼B

definiéndose los parámetros utilizados de la forma siguiente:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo tras los intervalos de tiempo Δt_1, Δt_2,..., Δt_n respectivamente (μg),

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo tras los intervalos de tiempo Δt_1, Δt_2,..., Δt_n respectivamente (μg),

$m_s^{des}(t_1)$, $m_s^{des}(t_2)$,... , $m_s^{des}(t_n)$ = masa de la sustancia medida en una alicuota (v_a^D) a los tiempo t_1,t_2,..., t_n, respectivamente (μg),

V_T = volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante et el experimento de cinética de desorcióh realizado con el método en serie (cm^3),

m_{aq}^A = masa de la sustancia problema que queda en solución una vez alcanzado el equilibr de adsorcióh debido a la sustitución incompleta del volumen (μg):

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R = volumen de sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3),

$v^D{}_a$ = volumen de la alícuota tomada del tubo para el análisis (i), durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie (cm^3):

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

Apéndice 6

ADSORCIÓN-DESORCIÓN EN SUELOS: FICHAS DE COMUNICACIÓN DE DATOS

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 ºC, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Adecuación del método analítico

Suelo pesado	g	
Suelo: masa seca	g	
Volumen de la solución de $CaCl_2$	cm^3	
Concentración final nominal sol de la solución	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentración final analítica sol de la solución	$\mu g\ cm^{-3}$	

Principio del método analítico utilizado:

Calibración del método analítico:

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 ºC, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Metodología analítica seguida: Indirecta ☐ Paralela ☐ En serie ☐

Directa ☐

Prueba de adsorción: muestras de ensayo

	Simbolo	Unidades	Tiempo equilibrado		Tiempo de equilibrado		Tiempo de equilibrado		Tiempo de equilibrado	
Nº tubo										
Suelo pesado	—	g								
Suelo: masa seca	m_{soil}	g								
Volumen de agua en el suelo pesado (calculado)	V_{ws}	cm^3								
Volumen de solución *CaCl,* 0,01 M para equilibrar el suelo		cm^3								
Volumen de solución madre		cm^3								
Volumen total tic fase acuosa en contacto con el suelo	V_o	cm^3								
Concentración inicial de la solución problema	C_o	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masa de la sustancia problema ni inicio de la prueba	m**0**	µg								

▼B

	Simbolo	Unidades	Tiempo equilibrado		Tiempo de equilibrado		Tiempo de equilibrado		Tiempo de equilibrado	
Iras agitación y centrifugación										
MÉTODO INDIRECTO										
Método paralelo										
Concentración de la sustancia problema lase acuosa, incluida corrección por blanco	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Método en serie										
Musa de la sustancia problema medida en la alícuota V_a	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
MÉTODO DIRECTO										
Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Calculo de la adsorción										
Adsorción	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Me-Jias										
Coeficiente	K_e	$cm^3\ g^{-1}$								
Medias										
Coefidence	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Medias										

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 ºC, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Prueba de adsorción: blancos y control

	Símbolo	Unidad	Blanco		Blanco		Control	
Nº tubo								
Suelo pesado		g					0	0
Cantidad de agua en el suelo pesado (calculada)		cm^3					—	—
Volumen añadido de solución $CaCl_2$ 0,01 M		cm^3						
Volumen añadido de la solución madre de le sustancia problema		cm^3	0	0				
Volumen total de fase acuosa (calculado)		cm^3					—	—

▼B

	Símbolo	Unidad	Blanco		Blanco		Control	
Concentración inicial de la sustancia problema en la fase acuosa		µg cm^{-3}						
Tras agitación y centrifugación								
Concentración en la fase acuosa		µg cm^{-3}						

Nota: Añádanse columnas en caso necesario.

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 ºC, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Balance de masa

	Símbolo	Unidad				
Nº tubo						
Suelo pesado	—	g				
Suelo: masa seca	m_{soil}	g				
Volumen de agua en suelo pesado (calculado)	V_{ws}	ml				
Volumen sol de la solución de $CaCl_2$ 0,01 M para equilibrar el suelo		ml				
Volumen de solución madre		cm^3				
Volumen total de fase acuosa en contacto con el suelo	V_0	cm^3				
Concentración inicial de la solución problema	C_0	µg cm^{-3}				
Tiempo de equilibrado	—	h				
Tras agitación y centrifugación						
Concentración de la sustancia problema en fase acuosa en equilibrio adsorción, incluida corrección por blanco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Tiempo de equilibrado	t_{eq}	h				
1ª dilución con solvente						
Volumen retirado fase acuosa	V_{rec}	cm^3				
Volumen añadido solvente	ΔV	cm^3				
1ª extracción con solvente						
Señal analizada en fase solvente	S_{E1}	var.				
Concentración de la sustancia problema en solvente	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Símbolo	Unidad				
Masa sustancia extraída del suelo y paredes recipiente	m_{E1}	µg				
2ª dilución con solvente						
Volumen retirado solvente	ΔV_5	cm^3				
Volumen añadido solvente	ΔV	cm^3				
2ª extracción con solvente						
Señal analizada en fase solvente	S_{E2}	var				
Concentración de la sustancia problema en sol-vente	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masa sustancia extraída del suelo y paredes recipiente	m_{E2}	µg				
Total masa sustancia problema extraída en dos pasos	m_E	µg				
Balance de masa	MB	%				

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 ºC, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Isotermas de adsorción

	Símbol	Unidad								
Nº tubo										
Suelo pesado	—	g								
Suelo: masa seca	E	g								
Volumen de agua en suelo pesado (calculado)	V_{ws}	cm^3								
Volumen de la solución de $CaCl_2$ 0,01 M para equilibrar el suelo		cm^3								
Volumen de solución madre añadido		cm^3								
Volumen total de fase acuosa en contacto con suelo (calculado)	V_0	cm^3								
Concentración solución	C_0	Mg cm^{-3}								
Tiempo de equilibrado	—	h								

▼B

	Símbol	Unidad								
Tras agitación y centrifugación										
Concentración de la sustan-cia en fase acuosa, incluida corrección por blanco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Masa adsorbida por unidad suelo	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Análisis de regresión:

valor de K_F^{ads}:

valor de 1/n:

coeficiente de regresión r^2:

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodología analítica seguida: Indirecta ☐ Paralela ☐ En serie ☐

Prueba de desorción

		Símbolo	Unidades	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo
Nº tubo de la fase de adsorción							
Masa de sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volumen retirado de fase acuosa, sustituido por $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volumen total de fase acuosa en contacto con suelo	PM SM SM	V_0 V_T	cm^3 cm^3				
Masa de la sustancia problema que queda en la solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a sustitución incompleta del volumen		m_{aq}^{A}	µg				
Cinética de desorción							
Masa medida de sustancia desorbida del suelo al tiempo t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volumen de solución tomado del tubo (i) para medir la sustancia problema	PM	$^{V1}{}_r$	cm^3				
	SM		cm^3				
Masa de sustancia desorbida del suelo al tiempo t_i (calculada)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masa de sustancia desorbida del suelo durante el intervalo de tiempo Δt_i (calculada)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Símbolo	Unidades	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo
Desorción porcentual						
Desorción al tiempo t_i		%				
Desorción al intervalo de tiempo Δt_i		%				
Coeficiente de desorción aparente						

PM: Método paralelo.

SM: Método en serie.

▼B

C.19. CALCULO DEL COEFICIENTE DE ADSORCIÓN (K_{OC}) EN SUELOS Y EN LODOS DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

1. MÉTODO

El presente método de ensayo reproduce las directrices del documento TG 121 de la OCDE (2000).

1.1. INTRODUCCIÓN

El comportamiento que presentan los compuestos en cuanto a su adsorción en suelos o en lodos de agua; residuales puede describirse mediante ciertos parámetros, para cuya determinación experimental se puede aplicar el método de ensayo C.18. Un parámetro importante es el coeficiente de adsorción, definido como la relación entre la concentración del compuesto en la muestra de suelo o lodo y la concentración del mismo en la fase acuosa, cuando la adsorción llega al equilibrio. El coeficiente de adsorción normalizado con respecto a contenido de carbono orgánico presente en el suelo, K_{oc}, constituye un útil indicador de la capacidad que presenta un producto químico para unirse a la materia orgánica de los suelos o los lodos de aguas residuales; este valor permite establecer comparaciones entre los diversos productos químicos. Se puede calcular este parámetro a través de correlaciones con la hidrosolubilidad y con el coeficiente de reparto n-octanol/agua (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

El método experimental descrito en este ensayo hace uso de una técnica de HPLC para calcular el coeficiente de adsorción, K_{oc}, en suelos y lodos de aguas residuales (8). La fiabilidad de los valores así obtenidos es superior a la de los cálculos efectuados por QSAR (9). Como método de cálculo, no puede sustituir completamente a los experimentos de equilibrio de lotes contemplados en el método de ensayo C.18. A pesar de ello, el K_{oc} calculado puede ser útil para escoger los parámetros de ensayo adecuados en los estudios de adsorción/desorción que siguen el método de ensayo C.18 calculando los valores K_d (coeficiente de distribución) o K_f (coeficiente de adsorción de Freundlich) según la ecuación 3 (véase el punto 1.2 a continuación).

1.2. DEFINICIONES

K_d: coeficiente de distribución, que se define como la relación existente entre las concentraciones en el equilibrio (C) de una sustancia problema disuelta en un sistema de dos fases: un adsorbente (suelo o lodo) más una fase acuosa; es un valor adimensional, cuando las concentraciones en ambas fases se expresan como peso/peso. Si la concentración del compuesto en la fase acuosa viene expresada como peso/volumen, las unidades de K_d son ml g^{-1}. K_d puede variar en función de las propiedades del adsorbente.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} o \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

donde:

C_{soil} = concentración de la sustancia problema en el suelo *(soil),* una vez alcanzado el equilibrio (μg . g^{-1})

C_{sludge} = concentración de la sustancia problema en el lodo *(sludge),* una vez alcanzado el equilibrio (μg . g^{-1})

C_{aq} = concentración de la sustancia problema en la fase acuosa, una vez alcanzado el equilibrio (μg . g^{-1}) μg . ml^{-1}).

▼B

K_f: coeficiente de adsorción de Freundlich, que se define como la concentración de la sustancia problema en el suelo o en el lodo de aguas residuales *(x/m)* cuando la concentración en la fase acuosa, llegado el equilibrio$_{aq}$, toma el valor 1; unidades: μg . g^{-1} de adsorbente. El valor puede variar en función de las propiedades del adsorbente.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log\ C_{aq} \qquad (2)$$

donde:

x/m = cantidad de sustancia problema *x* (μg g^{-1}) adsorbida por masa de adsorbente m (g), en el equilibrio,

1/n = pendiente de la isoterma de adsorción de Freundlich,

C_{aq} = concentración de la sustancia problema en la fase acuosa, en el equilibrio (μg ml^{-1}).

$$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log\ \frac{x}{m}$$

Cuando

K_{oc}: coeficiente de distribución (K_d) o coeficiente de adsorción de Freundlich (K_f) normalizado con respecto al contenido de carbono orgánico (f_{oc}) de un adsorbente; en el caso particular de productos químicos no ionizados, resulta un indicador aproximado para conocer la magnitud de la adsorción de un compuesto y permite establecer comparaciones entre diversos productos químicos. Según sean las dimensiones de K_d y K_f, K_{oc} puede ser adimensional o bien venir expresado en las unidades siguientes: ml . g^{-1} o μg . g^{-1} de materia orgánica.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\ \left(\text{adimensional o ml}\cdot g^{-1}\right)\ \text{o bien}\ \frac{Kf}{foc}(\mu g\cdot g^{-1}) \qquad (3)$$

La relación entre los coeficientes K_{oc} y K_d no siempre es lineal; así pues, la posible diferencia de los valores de K_{oc} entre uno y otro suelo es muy reducida, en comparación con la de los valores K_d o K_f.

A partir del coeficiente de distribución másica (k'), empleando un gráfico de calibración de log k' frente a log K_{oc} (registrado con los compuestos de referencia elegidos), se deduce el coeficiente de adsorción (K_{oc}).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (4)$$

donde:

t_R = tiempo de retención (en el cromatograma de HPLC) del compuesto problema o del compuesto de referencia (minutos),

t_0 = tiempo de retención de la fase móvil en la columna de HPLC (minutos) (véase el punto 1.8.2).

P_{ow} coeficiente de reparto octanol/agua, que se define como el cociente entre la concentración de la sustancia disuelta en n-octanol y la concentración de la misma disuelta en la fase acuosa; se trata de un valor adimensional.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq}(= Kow) \qquad (5)$$

1.3. COMPUESTOS DE REFERENCIA

Es necesario conocer, antes de aplicar el método, cuál es la fórmula estructural del compuesto, así como su pureza y su constante de disociación (en caso pertinente). Resulta útil contar con datos adicionales tales como la solubilidad en agua y, en disolventes orgánicos, el coeficiente de reparto octanol/agua y las características de hidrólisis.

▼B

A fin de establecer una correlación entre los datos de retención obtenidos mediante HPLC, relativos a la sustancia problema, y el coeficiente de adsorción de la misma, K_{oc}, se debe trazar un gráfico de calibración (log K_{oc} frente a log k'). Se empleará un mínimo de 6 puntos de referencia, al menos uno de ellos por encima y otro por debajo del valor previsto para la sustancia problema. La exactitud del método mejorará significativamente si se emplean compuestos de referencia que guarden una relación estructural con la sustancia problema. Si el analista no cuenta con este tipo de datos, deberá ser él quien elija los compuestos adecuados para la calibración. En tal caso, se optará por una serie más general de compuestos heterogéneos desde el punto de vista estructural. En el apéndice figura una lista de compuestos y de valores de K_{oc} aplicables para los análisis de lodos de aguas residuales (cuadro 1) o de suelos (cuadro 3). La elección de otros compuestos para la calibración deberá ser justificada.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se lleva a cabo una HPLC en columnas analíticas rellenas de una fase sólida de tipo cianopropilo, de las disponibles en el mercado, que contiene tanto grupos lipófilos como grupos polares. Se utiliza una fase estacionaria moderadamente polar basada en una matriz de sílice:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silice	grupo apolar separador	grupo polar

El principio del método de ensayo es similar al del método de ensayo A.8 (coeficiente de reparto, método de HPLC). Al ir atravesando la columna, junto con la fase móvil, la sustancia problema interacciona con la fase estacionaria. Como resultado del reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria, la sustancia problema experimenta una retención. La composición ambifílica de la fase estacionaria (partes polares y partes apolares) permite una interacción de los diversos grupos polares o apolares de cada molécula similar a la que tiene lugar en el caso de la materia orgánica en matrices tales como lodos de aguas residuales o suelos. Este hecho posibilita establecer una relación entre el tiempo de retención en la columna y el coeficiente de adsorción en la materia orgánica.

El pH ejerce una significativa influencia sobre la adsorción, particularmente en el caso de los compuestos polares. En el caso de suelos de cultivo o tanques de plantas de tratamiento de aguas residuales, el pH suele estar comprendido entre 5,5 y 7,5. Cuando se desea analizar compuestos ionizables, se debe llevar a cabo un ensayo con la forma ionizada y otro con la no ionizada, empleando las soluciones tampón adecuadas, aunque solo en aquellos casos en que al menos el 10 % del compuesto analizado se disocie a un pH de entre 5,5 y 7,5.

Para la evaluación se utiliza exclusivamente la relación entre la retención en la columna de HPLC y el coeficiente de adsorción, de modo que no es preciso aplicar un método de análisis cuantitativo: tan solo es necesario determinar el tiempo de retención. Si se dispone de una serie adecuada de compuestos de referencia y es posible aplicar las condiciones experimentales normales, el método constituye un modo rápido y eficaz para calcular el coeficiente de adsorción, K_{oc}.

1.5. APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método de HPLC es aplicable a aquellos productos químicos (marcados o no) para los cuales se disponga de un sistema de detección apropiado (por ejemplo, un espectrofotómetro, un detector de radiactividad) y que sean suficientemente estables durante todo el experimento. Puede resultar especialmente útil para analizar productos químicos cuyo estudio sea difícil mediante otros sistemas experimentales (compuestos volátiles, compuestos cuya solubilidad en agua no alcance una concentración que pueda determinarse desde el punto de vista analítico, compuestos con una elevada afinidad por la superficie de los sistemas de incubación). Se puede utilizar este método para analizar mezclas que originen al eluir bandas sin resolución. En este caso, se debe definir un margen de límites superior e inferior para los valores de log K_{oc} correspondientes a los compuestos de la mezcla problema.

▼B

La presencia de impurezas puede dificultar a veces la interpretación de los resultados de la HPLC; no obstante, su importancia será de índole menor en la medida en que se cuente con análisis que permitan identificar con claridad la sustancia problema y distinguirla de las impurezas.

Se ha validado el uso del método para analizar las sustancias citadas en el cuadro 1 del apéndice; igualmente, el método ha sido aplicado al análisis de muchos otros productos químicos comprendidos en las familias químicas siguientes:

— aminas aromáticas (por ejemplo, trifluralina, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilanilina, N-metilani-lina, l-naftilamina),

— ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (por ejemplo, benzoato de metilo, 3,5-dinitrobenzoato de etilo),

— hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, tolueno, xileno, etilbenceno, nitrobenceno),

— ésteres de ácidos ariloxifenoxipropiónicos (por ejemplo, metil diclofop, etil fenoxaprop, P-etil fenoxaprop),

— fungicidas con estructura de tipo imidazol o benzimidazol (por ejemplo, carbendazima, fuberidazol, tria-zóxido),

— amidas de ácidos carboxílicos (por ejemplo, 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenza-mida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida),

— hidrocarburos clorados (por ejemplo, endosulfán, DDT, hexaclorobenceno, quintoceno, 1,2,3-tricloroben-ceno),

— insecticidas organofosforados (por ejemplo, metil azinfos. disulfotón, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sul-profos, triazofos),

— fenoles (por ejemplo, fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2.4,6-triclorofenol, 1-naftol),

— derivados de la fenilurea (por ejemplo, isoproturón, monolinurón, pencicurón),

— colorantes (por ejemplo, Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— hidrocarburos poliaromáticos (por ejemplo, acenafteno, naftaleno),

— herbicidas con estructura de 1,3,5-triazina (por ejemplo, prometrina, propazina, simazina, terbutrina),

— derivados de tipo triazol (por ejemplo, tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

No es aplicable el método a aquellas sustancias que den lugar a una reacción con el eluyente o con la fase estacionaria. Tampoco a aquellas sustancias que interaccionen con componentes inorgánicos de modo específico (por ejemplo, las que formen complejos en racimo con los minerales de las arcillas). Puede ocurrir que el método no sirva en el caso de tensioactivos, compuestos inorgánicos y ácidos y bases orgánicos moderados o fuertes. Es posible determinar valores de log K_{oc} comprendidos entre 1,5 y 5,0. Para analizar compuestos ioni-zables, se debe emplear una fase móvil tamponada; no obstante, se tendrá cuidado de evitar que los componentes del tampón o la sustancia problema precipiten.

▼B

1.6. CRITERIOS DE CALIDAD

1.6.1. **Exactitud**

Normalmente, se puede calcular que el coeficiente de adsorción de una sustancia problema estará comprendido en el intervalo de ± 0,5 unidades logarítmicas del valor determinado por el método de equilibrio de lotes (véase el cuadro 1 del apéndice). Es posible lograr una mayor exactitud si los compuestos de referencia empleados guardan una relación estructural con la sustancia problema.

1.6.2. **Repetibilidad**

Se debe efectuar al menos un duplicado de cada determinación. Los valores de log K_{oc} obtenidos a partir de cada medición deben encontrarse en un intervalo de 0,25 unidades logarítmicas.

1.6.3. **Reproducibilidad**

La experiencia hasta ahora adquirida en la aplicación del método confirma la validez del mismo. Un estudio del método de HPLC, en el que se utilizaron 48 sustancias (plaguicidas en su mayoría) para las que se disponía de datos fiables respecto al K_{oc} en suelos, dio como resultado un coeficiente de correlación R = 0,95 (10) (11).

Con objeto de mejorar y validar el método, se llevó a cabo un ensayo comparativo en el que participaron 11 laboratorios (12). Los resultados están recogidos en el cuadro 2 del apéndice.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.7.1. **Estimación preliminar del coeficiente de adsorción**

Tanto el coeficiente de reparto octanol/agua P_{ow} (= K_{ow}) como, en cierta medida, la hidrosolubilidad pueden servir de indicadores del grado de adsorción, particularmente en el caso de compuestos no ionizados, de modo que pueden ser utilizados para prever la gama de valores. Existen numerosas correlaciones útiles publicadas, relativas a varios grupos de productos químicos (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Aparato**

Se debe disponer de un cromatógrafo de líquidos equipado con una bomba continua y un detector adecuado. Es conveniente utilizar una válvula de inyección junto con un bucle al efecto. Se emplearán resinas comerciales con grupos cianopropílicos enlazados covalentemente a un sustrato de sílice (por ejemplo, Hypersil y Zor-bax CN). Se puede intercalar una precolumna del mismo material entre el sistema de inyección y la columna en la que se realiza el análisis. Puede existir una considerable variabilidad entre las columnas que procedan de diferentes proveedores, manifestada en su eficacia para lograr la separación. Se deberán lograr los siguientes coeficientes de distribución másica, k', expuestos aquí como valores orientativos: log k' > 0,0 cuando log K_{oc} = 3,0, y log k' > -0,4 for cuando log K_{oc} = 2,0, al emplear como fase móvil una mezcla de metanol/agua (55 %/45 %).

1.7.3. **Fases móviles**

Se han estudiado varias fases móviles: se recomienda utilizar las dos siguientes:

— metanol/agua (55 %/45 % v/v),

— metanol/tampón de citrato 0,01M (pH = 6,0), (55 %/45 % v/v).

▼B

Para preparar el disolvente de elución, se emplea una mezcla de metanol para HPLC y agua destilada o tampón de citrato. La mezcla se desgasifica antes de ser utilizada. Se efectuará una elución isocrática. En el caso de que las mezclas de metanol/agua no sean apropiadas, es posible investigar mezclas de otros disolventes con agua, por ejemplo etanol/agua o bien acetonitrilo/agua. En el caso de compuestos ionizables, se recomienda emplear una solución tampón a fin de estabilizar el pH. Se debe procurar evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna, situaciones posibles al utilizar algunas mezclas de fase orgánica + tampón.

No es posible incluir aditivos tales como reactivos tipo par iónico, ya que pueden alterar las características de adsorción de la fase estacionaria. Tales alteraciones de la fase estacionaria pueden ser irreversibles. Así pues, los experimentos en los que intervengan aditivos deben ser realizados en columnas independientes.

1.7.4. **Solutos**

Se utilizará la fase móvil para disolver tanto la sustancia problema como los compuestos de referencia.

1.8. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.8.1. **Condiciones de ensayo**

Se registrará la temperatura a la que se realizan las mediciones. Es muy conveniente servirse de un compartimento termostatizado para la columna, para garantizar la constancia de las condiciones en que transcurre la calibración y las cromatografías para los cálculos o las mediciones de la sustancia problema.

1.8.2. **Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, t_0**

Para determinar el tiempo de retención de la fase móvil, t_0, se pueden emplear dos métodos distintos (véase también el punto 1.2).

1.8.2.1. *Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, t_0, mediante una serie homóloga*

Se ha demostrado que este procedimiento da lugar a valores de t_0 fiables y normalizados. Véase información detallada en el método de ensayo A.8: coeficiente de reparto (n-octanol/agua), método de HPLC.

1.8.2.2. *Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, t_0, utilizando compuestos inertes no retenidos por la columna*

Esta técnica consiste en inyectar soluciones de formamida, urea o nitrato de sodio. Se debe efectuar al menos un duplicado de cada medición.

1.8.3. **Determinación de los tiempos de retención, t_R**

Se elegirán compuestos de referencia conforme a lo descrito en el punto 1.3. Se puede efectuar una inyección de los mismos a modo de patrón mixto para determinar sus tiempos de retención, siempre que se haya confirmado que no existen interferencias recíprocas que alteren estos valores. Periódicamente, al menos 2 veces al día, se llevará a cabo una calibración, para tener en cuenta las potenciales variaciones imprevistas en cuanto a la eficacia de la columna. Una práctica muy adecuada consiste en efectuar las inyecciones de calibración tanto antes como después de inyectar la sustancia problema, al objeto de confirmar que no hayan variado los tiempos de retención. Se inyecta por separado cada sustancia problema, en cantidades tan reducidas como sea posible (para evitar una sobrecarga de la columna) y se procede a determinar sus tiempos de retención.

▼B

Para lograr una mayor fiabilidad de las mediciones, se realizará al menos un duplicado de cada determinación. Los valores de log K_{oc} obtenidos a partir de cada medición deben encontrarse en un intervalo de 0,25 unidades logarítmicas.

1.8.4. **Evaluación**

A partir del tiempo de retención de la fase móvil, t_0, y de los tiempos de retención de los compuestos de referencia elegidos, t_R, se calculan los coeficientes de distribución másica, *k′* aplicando la ecuación 4 (véase el punto 1.2). A continuación, se traza un gráfico en el que se representan los datos relativos al valor log k' de los compuestos de referencia frente a los respectivos valores log K_{oc} procedentes de los experimentos de equilibrio de lotes, mostrados en los cuadros 1 y 3 del apéndice. Interpolando en este gráfico el valor log k' correspondiente a cada sustancia problema, se obtiene entonces el respectivo valor log K_{oc}. Si los resultados reales indican que el log K_{oc} de la sustancia problema se sale del intervalo de calibración, se debe repetir el ensayo, empleando en este caso otros compuestos de referencia más apropiados.

2. **DATOS E INFORME**

El informe debe incluir la información siguiente:

— identidad y pureza de la sustancia problema y de los compuestos de referencia, así como valores de pKa en caso de que sea relevante.

— descripción del equipo y de las condiciones de trabajo, por ejemplo: tipo y dimensiones de la columna en la que se efectúa el análisis (y de la precolumna), medios de detección, fase móvil (proporción de los distintos componentes, pH), intervalo de temperaturas durante las mediciones,

— tiempo de retención de la fase móvil y método empleado para determinarlo,

— cantidades de la sustancia problema y de los compuestos de referencia introducidas en la columna,

— tiempos de retención de los compuestos de referencia utilizados para la calibración,

— representación gráfica y detalles relativos a la recta de regresión ajustada (log k' frente a log K_{oc}),

— datos sobre la retención media y valor log K_{oc} calculado para el compuesto problema,

— cromatogramas.

3. **REFERENCIAS**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol, 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 83 3-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel,). Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27-(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Apéndice

Cuadro 1

Comparación entre los valores de K_{oc} observados en suelos y en lodos de aguas residuales y los datos calculados aplicando el método de HPLC ([1]) ([2])

Compuesto	Nº CAS	log K_{oc} (lodos)	log K_{oc} (HPLC)	Δ	log K_{OC} (suelos)	Log K_{OC} (HPLC)	Δ
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linurón	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentión	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monurón	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreno	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoato de fenilo	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamida	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamida	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilida	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Cuadro 2

Resultados de un estudio comparativo, realizado en diferentes laboratorios para mejorar y validar el método de HPLC ([1]) **(11 laboratorios participantes)**

Compuesto	Nº CAS	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		(OCDE 106)	(método de HPLC)	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Cuadro 3

Compuestos de referencia recomendados para aplicar el método de HPLC conforme a los datos de adsorción a los suelos

Compuesto de referencia	Nº CAS	log K_{OC} (valores promedio), equilibrio de lotes	Nº de datos (K_{OC})	log de la desviación estándar	Fuente
Acetanilida	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamida	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzamida	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Metilbenzamida	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoato de metilo	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturón	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamida	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	(b)
3,5-Dinitrobenzamida	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazima	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazóxido	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linurón	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftaleno	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfán-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-8 5-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Triclorobenceno	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Metil diclofop	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantreno	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (mezcla)	26850-47-5 122,0-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel. J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen. W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.
(c) Datos facilitados por la industria.

▼B

C.20. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN *DAPHNIA MAGNA*

1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad para la reproducción es copia de las directrices TG 211 de la OCDE (1998).

1.1. INTRODUCCIÓN

La principal finalidad de este ensayo es evaluar el efecto de los productos químicos sobre el resultado reproductor de *Daphnia magna.*

1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

Parentales: hembras de *Dafnia* presentes al principio del ensayo y cuyo resultado reproductor constituye el objeto del presente estudio.

Descendientes: ejemplares de *Dafnia* jóvenes producidos por los parentales en el curso del ensayo.

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): concentración de ensayo mínima a la cual se ha observado que la sustancia ejerce un efecto significativo sobre la reproducción y la mortalidad de los parentales (para $p < 0,05$) en comparación con el control y dentro del período de exposición establecido. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa del modo en que se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

Concentración sin efecto observado (NOEC): concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el control, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del período de exposición establecido.

EC_X: concentración de la sustancia de ensayo disuelta en agua que produce una reducción del x % en la reproducción de *Daphnia magna* dentro del período de exposición establecido.

Tasa intrínseca de aumento: medida del crecimiento de la población que integra el resultado reproductor y la mortalidad específica de la edad (20) (21) (22). En poblaciones en equilibrio estacionario es cero. En poblaciones en crecimiento es positiva, y negativa en las que disminuyen. Obviamente, toda tasa negativa es insostenible y conduce a la extinción.

Límite de detección: concentración mínima que puede detectarse, aunque no cuantificarse.

Límite de determinación: concentración mínima que puede medirse cuantitativamente.

Mortalidad: un animal se considera muerto cuando está inmóvil, es decir, cuando es incapaz de nadar o cuando no mueve los apéndices ni la región posterior del abdomen 15 segundos después de la agitación suave del recipiente de ensayo (si se usa otra definición, debe documentarse junto con la referencia correspondiente).

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Las hembras jóvenes de *Dafnia* (los parentales), con una edad inferior a 24 horas al principio del ensayo, se exponen a la sustancia de ensayo añadida al agua a una gama de concentraciones. La duración del ensayo es de 21 días. Al final de este se evalúa el número total de descendientes vivos producidos por cada parental vivo. Esto significa que se excluyen de los cálculos los organismos inmaduros producidos por adultos que han muerto durante el ensayo. El resultado reproductor de los parentales se puede expresar de otras formas (por ejemplo, como número de descendientes vivos producidos por animal y por día a partir del primero en que se observa descendencia), pero estas deben documentarse además del número total de inmaduros producidos por parental vivo al final del ensayo. El resultado reproductor de los animales expuestos a la sustancia de ensayo se compara con el de los controles para determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y, por tanto, la concentración sin efecto observado (NOEC). Además, y en la medida de lo posible, los datos se analizan con ayuda de un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en el resultado reproductor (EC_{50}, EC_{20} o EC_{10}).

También hay que documentar la supervivencia de los parentales y el momento de la producción de la primera camada. Asimismo, pueden examinarse otros efectos vinculados con la sustancia sobre variables tales como el crecimiento (la longitud) y, posiblemente, la tasa intrínseca de aumento.

1.4. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Es preciso disponer de resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase la parte I del método C.2) realizado con *Daphnia magna*. El resultado puede ser útil para seleccionar un intervalo adecuado de concentraciones en los ensayos de reproducción. Deben conocerse la solubilidad en agua y la presión de vapor de la sustancia de ensayo, así como contar con un método analítico fiable para cuantificar la sustancia en las soluciones de ensayo con la eficiencia de recuperación y el límite de determinación establecidos.

Otros datos de la sustancia de ensayo potencialmente útiles para establecer las condiciones de ensayo son la fórmula estructural, la pureza de la sustancia, la estabilidad a la luz, la estabilidad en las condiciones del ensayo, los valores de pKa y P_{ow} y los resultados del ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido, los controles deben cumplir los criterios de comportamiento siguientes:

— la mortalidad de los parentales (hembras de *Dafnia*) no debe ser superior al 20 % al final del ensayo,

— el número medio de descendientes vivos producidos por cada parental superviviente al final del ensayo ha de ser ≥ 60.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con las soluciones de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Los recipientes de ensayo serán normalmente matraces de vidrio.

Además harán falta algunos de los instrumentos siguientes o todos ellos:

— aparato para medir el oxígeno (con microelectrodo o cualquier otro equipo que sea conveniente para medir el oxígeno disuelto en muestras de pequeño volumen),

▼B

— aparato adecuado para el control de la temperatura,

— medidor de pH,

— aparato para determinar la dureza del agua,

— aparato para determinar la concentración total de carbono orgánico (TOC) del agua o la demanda química de oxígeno (COD),

— aparato adecuado para controlar el régimen de iluminación y medir la intensidad luminosa.

1.6.2. **Organismo de ensayo**

La especie usada en el ensayo es *Daphnia magna* Straus. También pueden usarse otras especies de *Dafnia* siempre que reúnan los criterios de validez apropiados (el criterio de validez relativo al resultado reproductor de los controles debe ser relevante para la especie elegida). Si se usan otras especies de *Dafnia*, es preciso identificarlas con claridad y justificar su uso.

De preferencia, el clon debe identificarse genotípicamente. Las investigaciones realizadas (1) han demostrado que el comportamiento reproductor del clon A (procedente del IRCHA en Francia) (3) cumple siempre el criterio de validez de una media de ≥ 60 60 descendientes por parental que sobrevive cuando se cultiva en las condiciones descritas en este método. No obstante, son aceptables otros clones siempre que se demuestre que el cultivo de *Dafnia* cumple los criterios de validez del ensayo.

Al principio del ensayo, los animales tendrán una edad inferior a 24 horas y no deben ser progenie de primera camada. Han de proceder de una estirpe saludable (es decir, sin signos de agresión, tales como mortalidad elevada, presencia de machos y efipios, retraso de la producción de la primera camada, animales decolorados, etc.). Los animales de la estirpe deben mantenerse en condiciones de cultivo (luz, temperatura, medio, nutrición y animales por unidad de volumen) similares a las usadas en el ensayo. Cuando el medio de cultivo que vaya a usarse en el ensayo sea distinto del usado en el cultivo sistemático de *Dafnia*, es recomendable prever un período de aclimatación anterior al ensayo, por lo general de 3 semanas de duración (es decir, una generación), para evitar el estrés en los parentales.

1.6.3. **Medio de ensayo**

Es recomendable usar en este ensayo un medio definido completamente. Con ello se evita el uso de aditivos (tales como algas marinas, extracto de suelo, etc.) difíciles de caracterizar y aumentan en consecuencia las oportunidades de normalización entre laboratorios. Se ha observado que los medios Elendt M4 (4) y M7 (véase el apéndice 1) son adecuados para este propósito. No obstante, son aceptables medios distintos [por ejemplo, (5) (6)], siempre que se demuestre que el comportamiento del cultivo de Dafnia cumple los criterios de validez del ensayo.

Si se usan medios con aditivos sin definir, estos deben especificarse con claridad, y en el informe del ensayo hay que aportar información sobre su composición, en particular el contenido en carbono, pues podría contribuir a la dieta suministrada. Es recomendable determinar en la preparación madre del aditivo orgánico el carbono orgánico total (TOC), la demanda química de oxígeno (TOC) o las dos cosas, así como hacer una estimación de la contribución resultante al TOC y a la COD en el medio de ensayo. Conviene que la concentración de TOC en el medio (antes de incorporar las algas) sea inferior a 2 mg/l (7).

▼B

Si se ensayan sustancias que contengan metales, es importante tener en cuenta que las propiedades del medio de ensayo (por ejemplo, dureza, capacidad quelante) pueden afectar a la toxicidad de dichas sustancias. Por ello es deseable usar un medio totalmente definido. Sin embargo, en este momento, los únicos medios completamente definidos adecuados para el cultivo prolongado de *Daphnia magna* que se conocen son los Elendt M4 y M7. Ambos contienen el agente quelante EDTA. La práctica ha demostrado (2) que la «toxicidad aparente» del cadmio es generalmente inferior cuando el ensayo de reproducción se hace en medios M4 o M7 que cuando se hace en medios exentos de EDTA. Por tanto, M4 y M7 no son recomendables para ensayar sustancias con metales, y deben evitarse asimismo en estos casos otros medios que contengan agentes quelan-tes conocidos. En el caso de sustancias que contengan metales, puede ser aconsejable usar otros medios como, por ejemplo, agua dulce dura reconstituida según ASTM (7), que no contiene EDTA, enriquecida con extracto de algas marinas (8). Esta combinación de agua dulce dura reconstituida según ASTM y extracto de algas marinas es también apropiada para el cultivo prolongado y los ensayos con *Daphnia magna* (2), aun cuando ejerce una ligera acción quelante debida al componente orgánico del extracto de algas marinas.

Al principio del ensayo y durante este, la concentración de oxígeno disuelto debe ser superior a 3 mg/l. El pH debe estar comprendido entre 6 y 9, y normalmente no debe oscilar en más de 1,5 unidades en ninguno de los ensayos. Se recomienda utilizar una dureza superior a 140 mg/l (expresada como $CaCO_3$). Los ensayos realizados con valores iguales o superiores a este han demostrado un comportamiento reproductor compatible con los criterios de validez (9) (10).

1.6.4. **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución de reserva. A ser posible, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia en medio de ensayo.

En algunos casos puede ser necesario usar disolventes o dispersantes orgánicos para obtener una solución madre de concentración adecuada, aunque es preciso evitar en la medida de lo posible el uso de esta clase de materiales. Son ejemplos de disolventes adecuados la acetona, el etanol, el metanol, la dimetilformamida y el trietilenglicol. Son dispersantes adecuados el Cremophor RH40, la metilcelulosa al 0,01 % y el HCO-40. En cualquier caso, la cantidad de sustancia de ensayo contenida en las soluciones de ensayo no debe sobrepasar el límite de solubilidad en el medio de ensayo.

Los disolventes se usan para obtener una solución madre que pueda dosificarse con exactitud en agua. A la concentración de disolvente recomendada en el medio de ensayo final (< 0,1 ml/l), los disolventes indicados en el párrafo anterior no son tóxicos y no aumentan la solubilidad en agua de la sustancia.

Los dispersantes pueden facilitar la dosificación exacta y la dispersión. A la concentración recomendada en el medio de ensayo final (< 0,1 ml/l), los dispersantes indicados en el párrafo anterior no son tóxicos y no aumentan la solubilidad en agua de la sustancia.

▼B

1.7. DISEÑO DEL ENSAYO

Hay que asignar los tratamientos a los recipientes de ensayo y realizar todas las manipulaciones posteriores de dichos recipientes de forma aleatoria. De otro modo podría introducirse un sesgo susceptible de ser interpretado como efecto de una concentración. En particular, si las unidades experimentales se manipulan en orden de tratamiento o de concentración, determinados efectos vinculados con el tiempo, como la fatiga u otros errores del operador, podrían ejercer un efecto más acusado a concentraciones más elevadas. Además, si hay alguna probabilidad de que los resultados se vean afectados por una condición inicial o ambiental del ensayo, como la posición en el laboratorio, hay que pensar en la conveniencia de practicar agrupamientos.

1.8. PROCEDIMIENTO

1.8.1. **Condiciones de exposición**

1.8.1.1. *Duración*

La duración del ensayo es de 21 días.

1.8.1.2. *Carga*

Los parentales se mantienen separados, uno por recipiente de ensayo, con un volumen de 50 a 100 ml de medio en cada recipiente.

En ocasiones hay que emplear un volumen mayor para satisfacer los requisitos del método analítico usado para determinar la concentración de la sustancia de ensayo, aunque también se permite acumular los recipientes en paralelo para el análisis químico. Si se usan volúmenes superiores a 100 ml, puede ser necesario aumentar la ración administrada a *Dafnia* para garantizar una disponibilidad suficiente de nutrientes y para cumplir con los criterios de validez. En ensayos dinámicos pueden considerarse, por razones técnicas, otros diseños (por ejemplo, 4 grupos de 10 animales en un volumen de ensayo mayor); en cualquier caso, es preciso documentar cualquier modificación del diseño.

1.8.1.3. *Número de animales*

En ensayos semiestáticos, se mantienen por separado al menos 10 animales a cada concentración de ensayo y al menos 10 animales en la serie de control.

En ensayos dinámicos, se ha demostrado (1) que es adecuado repartir 40 animales en 4 grupos de 10 a cada concentración de ensayo. Puede usarse un número inferior de organismos de ensayo, y se recomienda un mínimo de 20 animales por concentración repartidos en 2 o más recipientes en paralelo de igual número de animales (por ejemplo, 4 recipientes en paralelo con 5 dáfnidos cada uno). Obsérvese que en los ensayos en los cuales se mantengan los animales en grupos, si los parentales mueren, no será posible expresar el resultado reproductor como número total de descendientes vivos producidos por parental vivo al final del ensayo. En tal caso, el resultado reproductor debe expresarse como «número total de descendientes vivos producidos por parental presente al principio del ensayo».

1.8.1.4. *Alimentación*

En ensayos semiestáticos, la alimentación debe ser preferentemente diaria; en cualquier caso, tendrá una frecuencia mínima de 3 veces por semana (es decir, en correspondencia con los cambios de medio). Deben documentarse las desviaciones con respecto a esta pauta (por ejemplo, ensayos dinámicos).

▼B

Durante el ensayo, la dieta de los parentales estará formada preferentemente por algas vivas de una o varias de las siguientes especies: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (ahora *Pseudokirchneriella subcapitata* (11) y *Scenedesmus subspicatus.* La dieta suministrada se basará en la cantidad de carbono orgánico (C) proporcionado a cada parental. Las investigaciones realizadas (12) han demostrado que, en el caso de *Daphnia magna,* son suficientes raciones comprendidas entre 0,1 y 0,2 mg C/Dafnia/día para alcanzar el número de descendientes necesarios para cumplir los criterios de validez. La ración puede administrarse a una tasa constante durante todo el período de ensayo o, si se prefiere, a una tasa inferior al principio que se va incrementando en función del crecimiento de los parentales. No obstante, en este caso, las raciones deben permanecer en todo momento dentro del intervalo recomendado de 0,1 a 0,2 mg C/*Dafnia*/día.

Si es preciso recurrir a parámetros indirectos, como el número de células de algas o la absorbancia luminosa, para determinar la ración adecuada (por razones de comodidad, pues medir el contenido de carbono requiere mucho tiempo), cada laboratorio debe crear su propio nomograma para la medición indirecta del contenido de carbono del cultivo de algas (véanse algunos consejos sobre construcción de nomogramas en el apéndice 2). Los nomogramas deben revisarse al menos una vez al año, y con mayor frecuencia si cambian las condiciones de los cultivos de algas. Se ha observado que la absorbancia luminosa proporciona una indicación del contenido de carbono mejor que el número de células (13).

Para reducir al mínimo el volumen de medio de cultivo de algas trasvasado a los recipientes de ensayo, la suspensión de algas administrada a *Dafnia* como alimento debe ser concentrada. Las algas pueden concentrarse mediante centrifugación seguida de resuspensión en agua destilada, agua desionizada o medio de cultivo de *Dafnia*.

1.8.1.5. *Iluminación*

16 horas de luz a una intensidad no superior a 15-20μE m^{-2} s^{-1}.

1.8.1.6. *Temperatura*

La temperatura del medio de ensayo debe encontrarse en el intervalo 18-22 ºC. No obstante, en un mismo ensayo, la temperatura no debe variar, a ser posible, más de 2 ºC dentro de estos límites (por ejemplo, 18-20, 19-21 o 20-22 ºC). Puede ser conveniente utilizar un recipiente de ensayo adicional con el fin de vigilar la temperatura.

1.8.1.7. *Aireación*

Los recipientes de ensayo no recibirán aireación durante el ensayo.

1.8.2. **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se prepararán al menos 5 concentraciones de ensayo en una serie geométrica con un factor de separación preferentemente no superior a 3,2; también hay que usar un número apropiado de recipientes en paralelo con cada concentración de ensayo (véase el punto 1.8.1.3). Si se usan menos de 5 concentraciones, hay que justificarlo. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el medio de ensayo.

▼B

Al determinar la gama de concentraciones, debe tenerse en cuenta lo siguiente:

i) si el objetivo es determinar los valores LOEC y NOEC, la concentración de ensayo mínima ha de ser lo suficientemente baja para que la fecundidad a esa concentración no sea significativamente inferior a la del control. En caso contrario, será necesario repetir el ensayo a una concentración mínima menor;

ii) si el objetivo es determinar los valores LOEC y NOEC, la concentración de ensayo máxima ha de ser lo suficientemente alta para que la fecundidad a esa concentración sea significativamente inferior a la del control. En caso contrario, será necesario repetir el ensayo a una concentración máxima mayor;

iii) si se estima el valor de EC_X para los efectos sobre la reproducción, es aconsejable usar concentraciones suficientes para definir dicho valor con un nivel de confianza adecuado. Si se estima la EC_{50} para los efectos sobre la reproducción, es aconsejable que la concentración de ensayo máxima sea superior a dicha EC_{50}. De otro modo, aunque seguiría siendo posible estimar el EC_{50}, el intervalo de confianza sería muy grande y no se podría evaluar satisfactoriamente la idoneidad del modelo ajustado;

iv) A ser posible, la gama de concentraciones de ensayo no debe incluir ninguna concentración que ejerza un efecto estadísticamente significativo sobre la supervivencia de adultos, puesto que esto cambiaría la naturaleza del ensayo, que de simple ensayo de reproducción se transformaría en un ensayo de reproducción y mortalidad, que exige un análisis estadístico mucho más complejo.

El conocimiento previo de la toxicidad de la sustancia de ensayo (derivado, por ejemplo, de estudios de toxicidad aguda y de determinación de gama) ayudará a elegir las concentraciones de ensayo adecuadas.

Si se usa un disolvente o un dispersante para facilitar la preparación de las soluciones de ensayo (véase el punto 1.6.4), su concentración final en los recipientes de ensayo no sobrepasará el valor de 0,1 ml/l, y será igual en todos los recipientes.

1.8.3. **Controles**

Además de la serie de ensayo, debe realizarse una serie de control con el medio de ensayo y, si procede, otra que contenga el disolvente o el dispersante. En este caso, la concentración de disolvente o dispersante ha de ser igual a la usada en los recipientes que contienen la sustancia de ensayo. Hay que emplear el número adecuado de recipientes en paralelo (véase el punto 1.8.1.3).

Por lo general, en un ensayo bien ejecutado, el coeficiente de variación con respecto al número medio de supervivientes vivos producido por cada parental de control debe ser $\leq$ 25 %; este valor debe documentarse para diseños de ensayo en los que se usen animales mantenidos por separado.

1.8.4. **Renovación del medio de ensayo**

La frecuencia de renovación del medio depende de la estabilidad de la sustancia de ensayo, pero debe ser al menos de 3 veces por semana. Si de los ensayos de estabilidad preliminares (véase el punto 1.4) se deduce que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, si está fuera del intervalo comprendido entre el 80 y el 120 % del valor nominal o si cae por debajo del 80 % de la concentración inicial medida) a lo largo del período de renovación máximo (3 días), hay que considerar la renovación más frecuente del medio o la realización de un ensayo dinámico.

▼B

Al renovar el medio en ensayos semidinámicos, se prepara una segunda serie de recipientes de ensayo y los parentales se transfieren a estos con ayuda, por ejemplo, de una pipeta de vidrio de diámetro adecuado. El volumen de medio transferido con los ejemplares de *Dafnia* debe reducirse al mínimo.

1.8.5. **Observaciones**

Los resultados de las observaciones hechas durante el ensayo deben consignarse en fichas de datos (véanse ejemplos en los apéndices 3 y 4). Si hacen falta otras mediciones (véanse los puntos 1.3 y 1.8.8), puede ser necesario realizar más observaciones.

1.8.6. **Descendientes**

Preferiblemente, los descendientes producidos por cada parental se retirarán y contarán a diario desde el nacimiento de la primera camada para evitar que consuman el alimento destinado al adulto. A los efectos de este método, solo es necesario contar el número de descendientes vivos, aunque debe registrarse la presencia de huevos abortados o de descendientes muertos.

1.8.7. **Mortalidad**

La mortalidad de los parentales se registrará preferiblemente a diario y al menos en las mismas ocasiones en que se cuenten los descendientes.

1.8.8. **Otras variables**

Aunque este método se ha diseñado principalmente para evaluar los efectos sobre la reproducción, quizá sea posible cuantificar otros efectos en medida suficiente para admitir el análisis estadístico. Las determinaciones relativas al crecimiento son muy interesantes, pues aportan información sobre posibles efectos subletales que pueden resultar más útiles que la simple determinación relativa a la reproducción; es recomendable proporcionar la determinación relativa a los parentales (la longitud del cuerpo sin contar la espina anal) al término del ensayo. Otras variables que podrían medirse o calcularse son el tiempo transcurrido hasta la producción de la primera camada (y de las siguientes), el número y el tamaño de las camadas por animal, el número de cama-das abortadas, la presencia de machos o efipios y la tasa intrínseca de aumento de la población.

1.8.9. **Frecuencia de los análisis y mediciones**

La concentración de oxígeno, la temperatura, la dureza y el pH deben medirse al menos una vez a la semana en los medios nuevo y antiguo, en los controles y a la concentración máxima de la sustancia de ensayo.

Durante el ensayo, las concentraciones de la sustancia analizada deben determinarse a intervalos regulares.

En ensayos semiestáticos en los que se espere que la concentración de la sustancia de ensayo se mantenga dentro del ± 20 % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80-120 %, véanse los puntos 1.4 y 1.8.4), se recomienda que las concentraciones de ensayo máxima y mínima se analicen recién preparadas y en el momento de su renovación al menos una vez durante la primera semana del ensayo (es decir, los análisis deben efectuarse en una muestra de la misma solución, recién preparada y en el momento de su renovación). A partir de este momento, las determinaciones han de repetirse a intervalos al menos semanales.

▼B

En ensayos en los que no se espere que la concentración de la sustancia de ensayo se mantenga dentro del ± 20 % de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo recién preparadas y en el momento de su renovación. No obstante, en los ensayos en los que la concentración inicial medida de la sustancia de ensayo no esté dentro del ± 20 % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80-120 % de la concentración inicial), las determinaciones químicas podrían limitarse en las semanas 2 y 3 del ensayo a las concentraciones máxima y mínima. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de la sustancia de ensayo antes de la renovación solo debe realizarse en un recipiente en paralelo de cada concentración de ensayo.

Para los ensayos dinámicos es apropiado un régimen de muestreo similar al descrito para los semiestáticos (si bien en este caso no cabe hacer determinaciones antes de renovar las soluciones). Sin embargo, puede ser aconsejable aumentar el número de ocasiones de muestreo durante la primera semana (tres series de mediciones, por ejemplo) para garantizar que las concentraciones de ensayo permanezcan estables. En esta clase de ensayos, los regímenes de flujo de diluyente y sustancia de ensayo deben verificarse a diario.

Si se demuestra que la concentración de la sustancia de ensayo se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, los resultados pueden basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación con respecto a la concentración nominal o inicial medida es superior al ± 20 %, los resultados deben expresarse en términos de media ponderada en función del tiempo (véase el apéndice 5).

2. RESULTADOS E INFORME

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El objeto de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el número total de descendientes vivos producidos por cada parental vivo al final del mismo. El número total de descendientes por parental debe calcularse para cada recipiente de ensayo (es decir, para cada recipiente en paralelo). Si en uno cualquiera de los recipientes en paralelo el parental muere durante el ensayo o resulta ser macho, dicho recipiente se excluye del análisis. Por tanto, este se basará en un número reducido de recipientes en paralelo.

Para estimar la LOEC y, por tanto, la NOEC, correspondiente a los efectos del producto químico sobre el resultado reproductor, es preciso calcular el resultado reproductor medio de los recipientes en paralelo para cada concentración y la desviación estándar residual acumulada, lo que puede hacerse mediante un análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se compara la media obtenida a cada concentración con la del control aplicando un método de comparación múltiple apropiado. Las pruebas de Dunnett o Williams pueden ser útiles (14) (15) (16) (17). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Es recomendable realizar esta verificación gráficamente en lugar de mediante una prueba formal de significación (18); una alternativa adecuada es aplicar una prueba de Bartlett. Si la hipótesis no se sostiene, hay que considerar la transformación de los datos para homogeneizar las varianzas antes de aplicar el ANOVA, o bien la realización de un ANOVA ponderado. Hay que calcular y documentar la magnitud del efecto detectable con el ANOVA (es decir, la mínima diferencia significativa).

▼B

Para estimar la concentración que provocaría la reducción en un 50 % del resultado reproductor (es decir, la EC_{50}), hay que ajustar a los datos una curva adecuada, tal como la curva logística, mediante un método estadístico como el de los mínimos cuadrados. La curva puede parametrarse de manera que la EC_{50} y su error estándar puedan estimarse directamente. Esto facilitará considerablemente el cálculo de los límites de confianza en torno a la EC_{50}. Salvo que haya razones de peso para preferir otros, deben darse límites de confianza bilaterales del 95 %. El método de ajuste debe proporcionar preferentemente un medio para evaluar la significación de la falta de ajuste. Esto puede hacerse gráficamente o dividiendo la suma residual de cuadrados en «falta de ajuste» y «componentes de error puro» y efectuando una prueba de significación para la falta de ajuste. Como los tratamientos que inducen fecundidad elevada tienen más probabilidades de inducir una varianza más elevada del número de inmaduros producidos que aquellos que inducen fecundidad reducida, hay que considerar la conveniencia de ponderar los valores observados de manera que reflejen las distintas varianzas de los diferentes grupos de tratamiento [véase información de tipo general en la referencia (18)].

En el análisis de los datos del estudio final interlaboratorios (2) se ha ajustado una curva logística usando el modelo siguiente, aunque pueden usarse otros adecuados:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

donde:

Y = número total de inmaduros por parental vivo al final del ensayo (calculado para cada recipiente)

x = concentración de sustancia

c = número esperado de inmaduros cuando x = 0

x_0 = EC_{50} en la población

b = parámetro «pendiente».

Este modelo será probablemente adecuado en gran número de situaciones, pero habrá ensayos para los cuales no sea apropiado. Es preciso comprobar la validez del modelo tal como se ha sugerido en párrafos anteriores. En algunos casos puede estar indicado un modelo de hormesis, según el cual concentraciones bajas producen efectos amplificados (19).

También pueden estimarse otras concentraciones que provoquen un porcentaje de efecto determinado, como la EC_{10} o EC_{20}, aunque quizá sea preferible parametrar el modelo de una forma distinta a la empleada para estimar la EC_{50}.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

▼B

— identificación química, incluida la pureza.

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— clon (si se ha tipificado genéticamente), proveedor u origen (si se conoce) y condiciones de cultivo aplicadas. Si se ha usado una especie distinta de *Daphnia magna,* debe consignarse y justificarse.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— método de ensayo utilizado (por ejemplo, semiestático o dinámico, con indicación de volumen y carga expresada en número de individuos de *Dafnia* por litro),

— fotoperíodo e intensidad luminosa,

— diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes en paralelo, número de parentales por recipiente en paralelo),

— detalles del medio de cultivo usado,

— si se usan, complementos de materia orgánica, con su composición, origen, método de preparación, TOC/COD de las preparaciones madre, estimación de los valores TOC/COD obtenidos en el medio de ensayo,

— información detallada de la alimentación, con indicación de la cantidad (en mg C/*Dafnia*/día) y el programa (tipo de alimento, con indicación en su caso del nombre específico (especie) del alga y, si se conocen, la cepa y las condiciones de cultivo),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (si se usan, hay que indicar el disolvente o dispersante y su concentración).

2.2.4. **Resultados:**

— resultados de cualesquiera estudios preliminares de estabilidad de la sustancia de ensayo,

— concentraciones de ensayo nominales y resultados de todos los análisis para determinar la concentración de la sustancia de ensayo en los recipientes de ensayo (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 4); también deben indicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de determinación,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo (pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto además de TOC y COD y dureza cuando proceda) (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 3),

— registro completo de los descendientes vivos de cada parental (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 3),

— número de muertes entre los parentales y día en que se hayan producido (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 3),

— coeficiente de variación de la fecundidad de los controles (basada en el número total de descendientes vivos por parental vivo al final del ensayo),

— representación gráfica del número total de descendientes vivos por parental (para cada recipiente en paralelo) vivo al final del ensayo frente a concentración de la sustancia de ensayo,

— concentración mínima con efecto observado (LOEC) para la reproducción, acompañada de una descripción de los métodos estadísticos aplicados y de una indicación de la magnitud del efecto detectable; concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC) para la reproducción; si procede, valores de LOEC y NOEC para la mortalidad de los parentales,

▼B

— si procede, EC_X para la reproducción e intervalos de confianza, así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva dosis-respuesta y su error estándar,

— otros efectos biológicos observados o medidos; hay que documentar todos los demás efectos biológicos observados o medidos (crecimiento de los parentales, por ejemplo) y la correspondiente justificación,

— explicación de cualquier desviación respecto al método de ensayo.

3. **REFERENCIAS**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the Daphnia magna Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C, Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of Daphnia *magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L, (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with Daphnia *magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims 1. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control.]. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

▼B

Apéndice 1

PREPARACIÓN DE MEDIOS ELENDT M7 Y M4 TOTALMENTE DEFINIDOS

Aclimatación a los medios Elendt M7 y M4

Algunos laboratorios han tenido dificultades para transferir directamente Dafnia a los medios M4 (1) y M7. Se han obtenido resultados bastante buenos con una aclimatación gradual, esto es, cambiando del medio propio a Elendt al 30 %, luego al 60 % y por último al 100 %. El período de aclimatación necesario puede ser bastante largo, incluso de un mes.

PREPARACIÓN

Oligoelementos

Se empieza por preparar soluciones madre distintas (I) de cada oligoelemento en agua de pureza apropiada (desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa). A partir de estas soluciones madre (I) se prepara una única solución madre (II) que contiene todos los oligoelementos (solución combinada):

Soluciones madre I (una sola sustancia)	Cantidad añadida al agua (mg/l)	Concentración (en relación con el medio M4) (veces)	Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I (ml/l)	
			M 4	M 7
$H_3 BO_3$	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2 * 4 H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2 * 6 H_20$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 * 2 H_20$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 * 6 H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$Na_2EDTA * 2 H_20$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 * 7 H_2O$	1 991	2 000	—	—

Las soluciones Na_2EDTA v $FeSO_4$ se preparan por separado, se vierten juntas y se esterilizan en autoclave inmediatamente. Se obtiene así:

Solución 21 Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼B

Medios M4 y M7

Los medidos M4 y M7 se preparan a partir de la solución madre II con los macronutrientes y las vitaminas que siguen:

	Cantidad añadida al agua (mg/l)	Concentración (en relación con el medio M4) (vecces)	Cantidad de solución madre añadida para preparar el medio (ml/l)	
			M 4	M 7
Solución madre II (combinación de oli-goe-lementos) II		20	50	50
Soluciones madre de macronutrientes (una sustancia por solución)				
$CaCl_2$ * 2 H_20	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Solución madre de vitaminas combinadas	—	10 000	0,1	0,1
La solución madre de vitaminas combinadas se prepara añadiendo las 3 vitaminas a 1 litro de agua como se indica a continuación:				
Clorhidrato de tiamina	750	10 000	—	—
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotina	7,5	10 000	—	—

La solución madre de vitaminas combinadas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas. Las vitaminas se incorporan a los medios poco antes de usarlos.

Notas: Para evitar la precipitación de las sales al preparar los medios completos, se incorporan las partes alícuotas de las soluciones madre a aproximadamente 500-800 ml de agua desionizada y a continuación se completa hasta obtener 1 litro.

La primera publicación del medio M4 puede encontrarse en Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultras-tructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154. pp. 25-33.

▼B

Apéndice 2

ANÁLISIS DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC) Y ELABORACIÓN DE UN NOMOGRAMA DEL CONTENIDO EN COT DEL ALIMENTO DE ALGAS

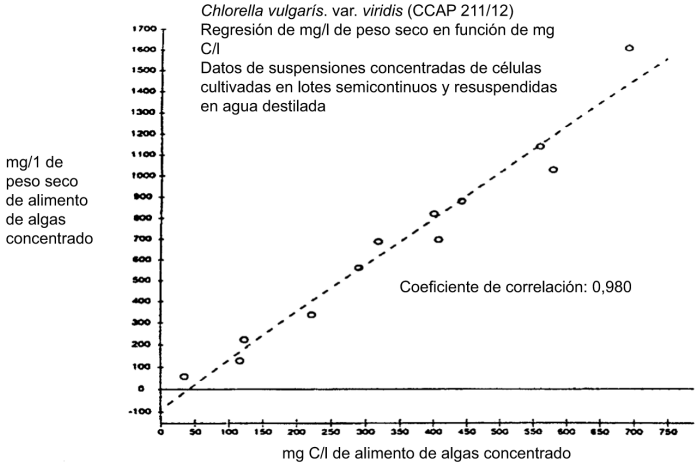
Es sabido que el contenido en carbono del alimento de algas no suele medirse directamente, sino por medio de correlaciones (es decir, de nomogramas) con medidas indirectas, como el número de células de algas o la absorbancia de luz.

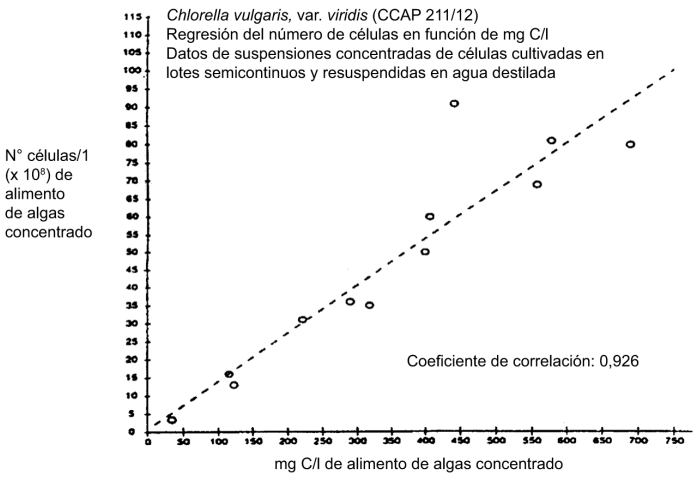
El TOC debe medirse por oxidación a alta temperatura y no con los métodos UV o del persulfato. (Véase: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para elaborar el nomograma, las algas se separan del medio de crecimiento por centrifugación seguida de resuspensión en agua destilada. Se mide la variable indirecta y la concentración de TOC en cada una de las muestras por triplicado. Hay que analizar controles con agua destilada únicamente y deducir la concentración de TOC a partir de la observada en la muestra de algas.

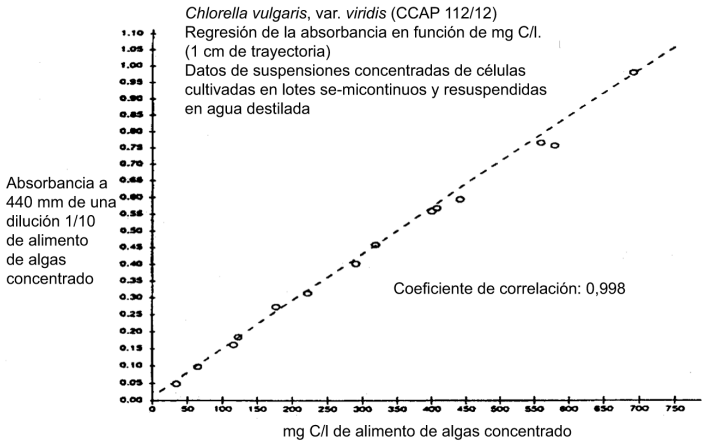
El nomograma debe ser lineal dentro del intervalo necesario de concentraciones de carbono. A continuación se ilustran algunos ejemplos.

Nota: No deben usarse para hacer conversiones; es esencial que cada laboratorio prepare sus propios nomogramas.





▼B


Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 112/12)
Regresión de la absorbancia en función de mg C/l.
(1 cm de trayectoria)
Datos de suspensiones concentradas de células cultivadas en lotes se-micontinuos y resuspendidas en agua destilada
Absorbancia a 440 mm de una dilución 1/10 de alimento de algas concentrado
Coeficiente de correlación: 0,998
mg C/l de alimento de algas concentrado

▼B

Apéndice 3

EJEMPLO DE FICHA DE DATOS RELATIVA A LA RENOVACIÓN DEL MEDIO, LA VIGILANCIA FISICOQUÍMICA Y LA ALIMENTACIÓN, REPRODUCCIÓN Y MORTALIDAD DE ADULTOS DE DAFNIA

Experimento Nº:	Fecha de inicio:				Clon:				Medio:				Tipo de alimento:			Sustancia de ensayo:				Concentración nominal:				
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renov. medio (marcar)																								
pH																							nuevo	
																							antiguo	
O_2 mg/l																							neuevo	
																							antiguo	
Temperatura (ºC)																							nuevo	
																							antiguo	
Aporte alim.																								
Nº descendientes vivos ([1])																								Total
Recipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — ES — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Experimento Nº:	Fecha de inicio:	Clon:	Medio:	Tipo de alimento:	Sustancia de ensayo:	Concentración nominal:

Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalidad acumulada adultos ([2])																								

([1]) Las camadas abortadas se registran escribiendo «AB» en la casilla correspondiente.
([2]) La mortalidad de los animales adultos se registra escribiendo «M» en la casilla correspondiente.

▼B

Apéndice 4

EJEMPLO DE FICHA DE DATOS RELATIVA A LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS

(a) **Concentraciones medidas**

Concentración nominal	Muestra semana 1		Muestra semana 2		Muestra semana 3	
	Después de la renovación	Antes de la renovación	Después de la renovación	Antes de la renovación	Después de la renovación	Antes de la renovación

(b) **Concentraciones medidas en porcentaje de la nominal**

Concentración nominal	Muestra semana 1		Muestra semana 2		Muestra semana 3	
	Después de la renovación	Antes de la renovación	Después de la renovación	Antes de la renovación	Después de la renovación	Antes de la renovación

▼B

Apéndice 5

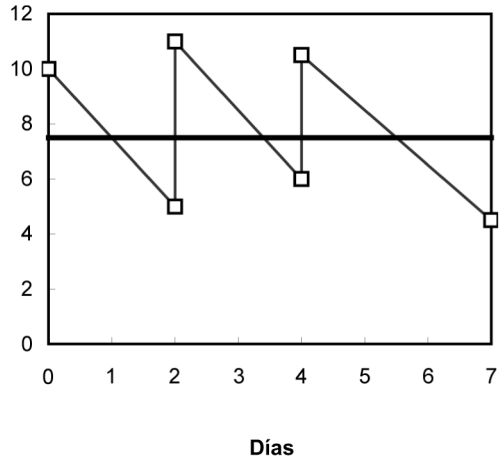
CÁLCULO DE UNA MEDIA PONDERADA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Media ponderada en función del tiempo

Puesto que la concentración de la sustancia de ensayo puede disminuir a lo largo del tiempo comprendido entre las sucesivas renovaciones del medio, es preciso considerar cuál es la concentración que debe elegirse como representativa de la gama de concentraciones aplicadas a los parentales de Dafnia. La elección debe basarse en consideraciones biológicas y estadísticas. Si, por ejemplo, se piensa que la mayor influencia en la reproducción la ejerce la máxima concentración aplicada, debe usarse este valor máximo. En cambio, si se considera más importante el efecto acumulado o a plazo más largo, la concentración media es más relevante. En este caso, una media apropiada es la concentración media ponderada en función del tiempo, pues tiene en cuenta la variación de la concentración instantánea a lo largo del tiempo.

figura 1

Ejemplo de media ponderada en función del tiempo



La figura 1 ilustra un ejemplo de ensayo (simplificado) de 7 días de duración en el cual el medio se renueva los días 0, 2 y 4.

— La línea delgada en zigzag representa la concentración a lo largo del tiempo. Se supone que el descenso de la concentración es exponencial.

— Los 6 puntos representados corresponden a las concentraciones medidas al principio y al final de cada período de renovación.

— La línea gruesa indica la posición de la media ponderada en función del tiempo.

La media ponderada en función del tiempo se calcula de manera que el área situada bajo ella sea igual al área situada bajo la curva de concentración. El cálculo correspondiente al ejemplo anterior se ilustra en el cuadro 1.

▼B

Cuadro 1

Cálculo de la media ponderada en función del tiempo

Renovación nº	Días	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Área
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Días totales: 7					Área total	50,091
					Media PT	7,156

Días: número de días del período de renovación.

Conc0: concentración medida al principio de cada período de renovación.

Conc1: concentración medida al final de cada período de renovación.

Ln(Conc0): logaritmo natural de Conc0.

Área: área comprendida bajo la curva exponencial para cada período de renovación. Se calcula como sigue:

Ln(Conc1): logaritmo natural de Conc1.

$$Area = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Days$$

La media ponderada en función del tiempo *(Media P*T) es igual al *Área total* dividida por los *Días totales*.

Naturalmente, en el caso de un ensayo de reproducción de *Dafnia*, el cuadro debería cubrir 21 días.

Es obvio que, si solo se hacen observaciones al principio y al final de cada período de renovación, es imposible confirmar que el proceso de disminución sea, en efecto, exponencial. Una curva distinta daría lugar a un cálculo de *Área* distinto. En cualquier caso, la disminución exponencial es una hipótesis plausible, y esta es probablemente la curva mejor a falta de más datos.

Es preciso hacer una advertencia para el caso de que el análisis químico no logre detectar ninguna sustancia al final del período de renovación. Salvo que se pueda estimar la velocidad con que la sustancia desaparece de la solución, será imposible obtener un área bajo la curva realista y, por tanto, obtener una media ponderada en función del tiempo que sea razonable.

▼B

C.21. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL NITRÓGENO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 216 (2000).

1.1. INTRODUCCIÓN

Este método de ensayo es un método de laboratorio destinado a investigar los efectos a largo plazo de productos químicos, tras una exposición única, en la transformación del nitrógeno por los microorganismos del suelo. El ensayo se basa principalmente en las recomendaciones de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (1). Sin embargo, se han tenido en cuenta otras directrices, como las del Biologische Bundesanstalt (2) de Alemania, la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos (3) la Sociedad de Química y Toxicología Medioambientales *(Society of Environmental Toxicology and Chemistry,* SETAC) (4) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) (5). En un taller de la OECD sobre selección de suelos/sedimentos, celebrado en Belgirate, Italia, en 1995 (6) se acordó el número y el tipo de suelos que deben usarse en este ensayo. Las recomendaciones sobre recogida, manejo y almacenamiento de muestras de suelo se basan en un documento orientativo de la ISO (7) y en las recomendaciones del taller de Belgirate. En la valoración y evaluación de las características de las sustancias de ensayo, puede resultar necesaria la determinación de los efectos de la actividad microbiana en el suelo, por ejemplo, cuando se requieran datos sobre los posibles efectos secundarios de los productos fitosanitarios en la microflora del suelo o cuando sea previsible la exposición de los microorganismos del suelo a los productos químicos distintos de los fitosanitarios. El ensayo de transformación del nitrógeno se lleva a cabo para determinar los efectos de estos productos químicos en la microflora del suelo. Si se ensayan productos agroquímicos (por ejemplo, productos fitosanitarios, abonos y productos químicos para la silvicultura), se llevarán a cabo tanto ensayos de transformación del nitrógeno como del carbono. Si se ensayan productos no agroquímicos, es suficiente el ensayo de transformación del nitrógeno. Sin embargo, si los valores EC_{50} del ensayo de transformación del nitrógeno de estos productos químicos se sitúan dentro del intervalo encontrado para los inhibidores de la nitrificación disponibles en el comercio (por ejemplo, la nitrapirina), puede hacerse un ensayo de transformación del carbono para obtener más información.

Los suelos están formados por componentes vivos y no vivos que se dan en mezclas complejas y heterogéneas. Los microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y transformación de la materia orgánica en los suelos fértiles. Existen muchas especies que contribuyen de diversas maneras a la fertilidad del suelo. Cualquier interferencia a largo plazo en estos procesos bioquímicos podría perturbar el ciclo de los nutrientes y alterar la fertilidad del suelo. La transformación del carbono y del nitrógeno se da en los suelos fértiles. Aunque las comunidades microbianas responsables de estos procesos difieren de unos suelos a otros, las vías de transformación son esencialmente las mismas.

Este método de ensayo está destinado a detectar los efectos negativos a largo plazo de una sustancia en el proceso de transformación del nitrógeno en los suelos aerobios de superficie. El método también permite calcular los efectos de una sustancia en la transformación del carbono por la microflora del suelo. La formación de nitratos se produce tras la degradación de los enlaces carbono-nitrógeno. Por tanto, si se encuentran índices iguales de producción de nitratos en suelos tratados y suelos de control, es muy probable que las principales rutas de degradación del carbono estén intactas y funcionales. El sustrato elegido para el ensayo (la harina de alfalfa) tiene una proporción carbono/nitrógeno favorable (normalmente entre 12/1 y 16/1). Por eso, la privación de carbono durante el ensayo es reducida y las comunidades microbianas, si resultan dañadas por una sustancia química, pueden recobrarse dentro de un plazo de 100 días.

▼B

Los ensayos a partir de los cuales se desarrolló este método estaban pensados principalmente para sustancias respecto a las cuales puede preverse la cantidad que llegará al suelo. Este es el caso, por ejemplo, de los productos fitosanitarios cuyo índice de aplicación al campo es conocido. Para los productos agroquímicos, es suficiente el ensayo de 2 dosis con arreglo al índice de aplicación estimado o previsto. Los productos agroquímicos pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados. Sin embargo, el ensayo no se limita a los productos agroquímicos. Cambiando tanto las cantidades de la sustancia de ensayo aplicada al suelo como la manera en que se evalúan los datos, el ensayo puede usarse también para productos químicos cuando se desconozca la cantidad de estos que llegará al suelo. De este modo, en el caso de los productos químicos distintos de los agrícolas, se determinan los efectos de una serie de concentraciones en la transformación del nitrógeno. A continuación, se utilizan los datos de estos ensayos para trazar una curva dosis-respuesta y calcular los valores EC_X, donde x es el porcentaje de efecto definido.

1.2. DEFINICIONES

Transformación del nitrógeno: es la degradación última por microorganismos de materia orgánica que contenga nitrógeno, mediante un proceso de amonificación y nitrificación, hasta llegar al nitrato inorgánico respectivo.

EC_X (concentración efectiva): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un porcentaje x de inhibición de la transformación de nitrógeno en nitrato.

EC_{50} (concentración efectiva mediana): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un 50 % de inhibición de la transformación de nitrógeno en nitrato.

1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Ninguno.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Al suelo tamizado se le añade harina vegetal y, a continuación, se trata una parte con la sustancia de ensayo y se deja la otra sin tratar (control). Cuando se ensayen productos agroquímicos, se recomienda un mínimo de 2 concentraciones de ensayo, que deben elegirse en relación con la concentración más alta prevista para el campo. Después de 0,7, 14 y 28 días de incubación, se extraen muestras de suelos tratados y de control con un disolvente apropiado y se determinan las cantidades de nitrato en los extractos. El índice de formación de nitratos en las muestras tratadas se compara con el de las de control y se calcula el porcentaje de desviación de las muestras tratadas respecto a las de control. Todos los ensayos tendrán una duración mínima de 28 días. Si, al 28º día, la diferencia entre los suelos tratados y los no tratados es igual o superior al 25 %, se continuarán las mediciones hasta un máximo de 100 días. Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se añadirá a las muestras de suelo una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo y se medirán al cabo de 28 días de incubación la cantidades de nitratos formadas en las muestras tratadas y de control. Los resultados de los ensayos con concentraciones múltiples se analizarán utilizando un modelo de regresión y se calcularán los valores EC_X (es decir, EC_{50}, EC_{25} y/o EC_{10}). Véanse las definiciones.

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Las evaluaciones de los resultados de los ensayos se basan en diferencias relativamente pequeñas (es decir, un valor medio de ± 25 %) entre concentraciones de nitratos en las muestras tratadas y de control, de modo que grandes variaciones en las muestras de control pueden dar lugar a resultados falsos. Por ello, la variación entre muestras de control en paralelo debe ser inferior al ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Equipo**

Se utilizarán recipientes de ensayo hechos de material químicamente inerte. Estos recipientes deben ser de capacidad adecuada de acuerdo con el procedimiento utilizado para la incubación de suelos, es decir, incubación en una muestra única o en una serie de muestras separadas (véase el punto 1.7.1.2). Hay que procurar reducir al mínimo la pérdida de agua y permitir el intercambio de gas durante el ensayo (por ejemplo, los recipientes pueden cubrirse con láminas de polietileno perforado). Cuando se ensayen sustancias volátiles, deben usarse recipientes sellables y herméticos cuyo tamaño sea tal que aproximadamente un cuarto de su volumen esté ocupado por la muestra de suelo.

Se utilizará equipo de laboratorio estándar, incluyendo:

— mecanismo de agitación: agitador mecánico o equipo equivalente,

— dispositivo de centrifugado (3 000 g) o filtrado (utilizando papel de filtro sin nitratos),

— instrumental de sensibilidad y reproductibilidad adecuadas para el análisis de nitratos.

1.6.2. **Selección y número de suelos**

Se utilizará un único suelo cuyas características recomendadas serán las siguientes:

— contenido de arena: entre el 50 % y el 75 %,

— pH: 5,5-7,5,

— contenido de carbono orgánico: 0,5-1,5 %

— debe medirse la masa microbiana (8) (9), cuyo contenido de carbono tiene que ser al menos el 1 % del total de carbono orgánico en el suelo.

En la mayoría de los casos, un suelo con estas características representa la situación más desfavorable, ya que la adsorción de la sustancia química de ensayo es mínima y su disponibilidad para la microflora es máxima. Por lo tanto, no son necesarios, por lo general, ensayos de otros suelos. Sin embargo, en algunas circunstancias, por ejemplo, cuando la sustancia de ensayo esté indicada principalmente para determinados suelos, como los suelos forestales ácidos, o en el caso de productos químicos cargados electrostáticamente, puede resultar necesario utilizar algún otro suelo.

▼B

1.6.3. **Recogida y almacenamiento de muestras de suelo**

1.6.3.1. *Recogida*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del campo de donde se recoja la tierra para el ensayo. Se necesitan datos, entre otras cosas, de la localización exacta, la cubierta vegetal, fechas de tratamiento con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos orgánicos e inorgánicos, aplicación de sustancias biológicas o contaminación accidental. El lugar elegido para la recogida de suelo tiene que ser tal que permita un uso a largo plazo. Se consideran adecuados los pastos permanentes, los campos con cosechas anuales de cereales (excepto el maíz) o los abonos verdes sembrados densamente. El lugar donde se recojan las muestras no debe haberse tratado con productos fitosanitarios durante un mínimo de un año antes de la recogida de estas. Además, no debe haberse aplicado ningún abono orgánico durante al menos 6 meses. El uso de abonos minerales solo es aceptable cuando esté en concordancia con las necesidades del cultivo, en ese caso no deben tomarse muestras hasta transcurridos, al menos, 3 meses desde la aplicación del abono. Debe evitarse el uso de suelo tratado con abonos con efectos biocidas conocidos (por ejemplo, cianamida de calcio).

Hay que evitar la toma de muestras durante o inmediatamente después de períodos prolongados (de más de 30 días) de sequía o encharcamiento. En el caso de los suelos arados, deben tomarse muestras a una profundidad de 0 a 20 cm. Cuando se trate de pastizales u otros suelos que no se aren durante períodos más largos (al menos un ciclo de cultivo), la profundidad máxima del muestreo puede ser ligeramente superior a 20 cm (por ejemplo, 25 cm).

Las muestras de suelo deben transportarse en recipientes y en condiciones de temperatura que garanticen que las propiedades iniciales del suelo no se alteren significativamente.

1.6.3.2. *Almacenamiento*

Es preferible el uso de muestras de suelo recién recogidas. Si no se puede evitar el almacenamiento en el laboratorio, las muestras de suelo pueden guardarse en la oscuridad a 4 ± 2 ºC durante un máximo de 3 meses. Durante el almacenamiento, debe asegurarse el mantenimiento de condiciones aerobias. Si se recogen muestras de suelo de zonas que estén congeladas durante, al menos, tres meses al año, puede considerarse la posibilidad de almacenarlas durante 6 meses a entre - 18 ºC y - 22 ºC. Se medirá la biomasa microbiana de las muestras almacenadas antes de cada experimento. La cantidad de carbono en la biomasa debe ser como mínimo el 1 % del total de carbono orgánico de la muestra de suelo (véase el punto 1.6.2).

1.6.4. **Manejo y preparación del suelo para el ensayo**

1.6.4.1. *Preincubación*

Cuando las muestras de suelo hayan estado almacenadas (véase el punto 1.6.3.2), se recomienda preincubar durante un período de entre 2 y 28 días. La temperatura y la humedad del suelo durante la preincubación deben ser semejantes a las que se den durante el ensayo (véanse los puntos 1.6.4.2 y 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Características fisicoquímicas*

Se separarán manualmente los objetos grandes (por ejemplo, piedras, trozos de plantas, etc.) de la muestra de suelo y, a continuación, se tamizará la muestra por vía húmeda sin secar en exceso para obtener un tamaño de las partículas no superior a 2 mm. Deberá ajustarse el contenido de humedad de la muestra con agua destilada o desionizada para llegar a un valor entre el 40 % y el 60 % de la capacidad máxima de retención de agua.

1.6.4.3. *Adición de sustrato orgánico*

La muestra de suelo debe mezclarse con un sustrato orgánico adecuado, por ejemplo, harina de alfalfa-hierba-forraje verde (principal componente: *Medicago sativa)* con una proporción C/N entre 1271 y 16/1. La proporción alfalfa-muestra de suelo recomendada es 5 g de alfalfa por kilo de muestra (peso en seco).

1.6.5. **Preparación de la sustancia de ensayo para la aplicación al suelo**

La sustancia de ensayo se aplica normalmente utilizando un vehículo. El vehículo puede ser agua (para las sustancias solubles en el agua) o un sólido inerte como arena fina de cuarzo (tamaño de las partículas: 0,1-0,5 mm). Deben evitarse los vehículos líquidos distintos del agua (por ejemplo, disolventes orgánicos como la acetona o el cloroformo) porque pueden dañar la microflora. Si se usa arena como vehículo, puede recubrirse con la sustancia de ensayo disuelta o suspendida en un disolvente apropiado. En tal caso, debe eliminarse el disolvente por evaporación antes de mezclarse con la muestra de suelo. Para una distribución óptima de la sustancia de ensayo en el suelo, se recomienda una proporción de 10 g de arena por kilo de suelo (peso en seco). Las muestras de control se tratarán solo con una cantidad equivalente de agua y/o arena de cuarzo.

Cuando se ensayen sustancias químicas volátiles, deben evitarse pérdidas durante el tratamiento en la medida de lo posible y habrá que procurar conseguir una distribución homogénea en la muestra de suelo (por ejemplo, deberá inyectarse la sustancia de ensayo en la muestra en varios sitios).

1.6.6. **Concentraciones de ensayo**

Cuando se ensayen productos agroquímicos, deberán utilizarse al menos 2 concentraciones. La concentración más baja debe corresponder, al menos, a la cantidad máxima que se prevé que llegue al suelo en la práctica mientras la concentración más alta tiene que ser un múltiplo de la concentración más baja. Las concentraciones de la sustancia de ensayo añadida al suelo se calcula suponiendo una incorporación uniforme a una profundidad de 5 cm y una densidad aparente del suelo de 1,5. Para los productos agroquímicos que se aplican directamente al suelo o para las sustancias químicas para las cuales puede calcularse la cantidad que llega al suelo, las concentraciones de ensayo recomendadas son la máxima concentración ambiental prevista [Predicted Environmental Concentration (PEC)]. Las sustancias destinadas a ser aplicadas a los suelos varias veces a lo largo de un ciclo tiene que ensayarse a concentraciones resultantes de multiplicar la PEC por el número máximo de aplicaciones previsto. Sin embargo, la concentración superior ensayada no debe superar 10 veces el índice máximo para una aplicación. Si se ensayan productos químicos no agrícolas, se empleará una serie geométrica de, al menos, 5 concentraciones. Las concentraciones ensayadas han de cubrir el intervalo necesario para determinar los valores EC_X.

▼B

1.7. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.7.1. **Condiciones de exposición**

1.7.1.1. *Tratamiento y control*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en 3 partes de igual peso. Dos partes se mezclarán con el vehículo que contenga el producto y la otra, con el vehículo sin el producto (control). Se recomienda un mínimo de 3 copias para ambos tipos de muestras, las tratadas y las no tratadas. Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, la muestra de suelo se dividirá en 6 partes de igual peso. 5 de las muestras se mezclarán con el vehículo que contenga la sustancia de ensayo y la sexta, con el vehículo sin la sustancia. Se recomienda preparar 3 copias tanto para las muestras tratadas como para las de control. Debe procurarse una distribución homogénea de la sustancia de ensayo en las muestras tratadas. Durante la mezcla, se evitará la compactación de la muestra o la formación de grumos.

1.7.1.2. *Incubación de las muestras de suelo*

La incubación de las muestras de suelo puede hacerse de dos maneras: como dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, o como una serie de submuestras separadas de igual tamaño de suelo tratado, por una parte, y de suelo no tratado, por otra. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, el ensayo solo debe hacerse con una serie de submuestras separadas. Cuando las muestras de suelo se incuben en una muestra única, se prepararán grandes cantidades de suelo tratado y no tratado, y se tomarán las submuestras que deban analizarse según se necesite a lo largo del ensayo. La cantidad preparada inicialmente para las muestras tratadas y para las de control dependerá del tamaño de las submuestras, el número de ejemplares utilizados para el análisis y el número máximo previsto de períodos de muestreo. Las muestras de suelo incubadas como muestra única deben mezclarse bien antes de preparar submuestras. Cuando la incubación se haga en una serie de muestras separadas, las dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, se dividirán en el número de submuestras requerido, y estas se utilizarán según se necesite. En los experimentos en los que puedan preverse más de dos tiempos de muestreo, habrán de prepararse las submuestras suficientes, teniendo en cuenta los ejemplares y los tiempos de muestreo. Deberán incubarse, al menos, 3 copias de las muestras de ensayo en condiciones aerobias (véase el punto 1.7.1.1). Durante todos los ensayos, se utilizarán recipientes adecuados con suficiente espacio libre para evitar la aparición de condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, el ensayo solo debe hacerse con una serie de submuestras separadas.

1.7.1.3. *Condiciones y duración del ensayo*

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura de 20 ± 2 ºC. La humedad de las muestras se mantendrá durante el ensayo entre el 40 % y el 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del suelo (véase el punto 1.6.4.2) con una variación máxima del ±5 %. Podrá añadirse agua destilada y desionizada según se necesite.

La duración mínima del ensayo es de 28 días. Cuando se ensayen productos agroquímicos, se compararán los índices de formación de nitrato en las muestras tratadas y de control. Si estos índices difieren en más del 25 % al 28º día, se continuará el ensayo hasta que se obtenga una diferencia igual o menor al 25 % o bien durante un máximo de 100 días. En el caso de los productos químicos no agrícolas, se pondrá fin al ensayo a los 28 días. Al 28º día, se determinarán las cantidades de nitratos en las muestras tratadas y de control y se calcularán los valores EC_X.

▼B

1.7.2. **Toma de muestras y análisis de suelos**

1.7.2.1. *Calendario de toma de muestras*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, se hará el análisis de nitratos en las muestras de suelo los días 0, 7, 14 y 28. Cuando se necesite un ensayo prolongado, se harán nuevas mediciones a intervalos de 14 de días a partir del 28o día.

Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se utilizarán como mínimo 5 concentraciones de ensayo y se hará el análisis de nitratos en las muestras de suelo al principio (día 0) y al final del período de exposición (28 días). Si se considera necesario, puede añadirse una medición intermedia, por ejemplo, al séptimo día. Los datos obtenidos al 28º día se utilizarán para hallar el valor EC_x de la sustancia química. Si se desea, pueden utilizarse los datos de las muestras de control obtenidos el día 0 para indicar la cantidad inicial de nitratos en el suelo.

1.7.2.2. *Análisis de las muestras de suelo*

La cantidad de nitratos formada en cada ejemplar de muestra tratado y de control se determinará en cada tiempo de muestreo. Los nitratos se extraerán de la muestra de suelo agitándola con un disolvente de extracción adecuado, por ejemplo, una solución 0,1 M de cloruro de potasio. Se recomienda una proporción de 5 ml de KCl por gramo equivalente de suelo en peso seco. Para optimizar la extracción, los recipientes que contengan la muestra de suelo y la solución de extracción no deberán llenarse más de la mitad. Las mezclas se agitarán a 150 rpm durante 60 minutos. A continuación, se centrifugarán o filtrarán y se analizará la fase líquida para hallar los nitratos. Los extractos líquidos sin partículas pueden almacenarse antes del análisis a menos 20 ± 5 ºC hasta 6 meses.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

Si se hacen ensayos con productos agroquímicos, deberán registrarse las cantidades de nitratos formadas en cada copia de muestra de suelo y darse en forma de tabla los valores medios de todos los ejemplares. Se evaluarán los índices de transformación del nitrógeno mediante métodos estadísticos apropiados y generalmente aceptables (por ejemplo, test-F, nivel de significación del 5 %). Las cantidades de nitrato formadas se expresarán en mg de nitrato/kg de muestra (peso seco)/día. La tasa de formación de nitrato en cada tratamiento se comparará con el de la muestra de control y se calculará el porcentaje de desviación respecto a esta.

Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se determinará la cantidad de nitratos formada en cada copia y se trazará una curva dosis-respuesta para el cálculo de los valores EC_x. Las cantidades de nitratos (es decir, mg de nitratos/kg de muestra en peso seco) halladas en las muestras tratadas a los 28 días se compararán con las halladas en las muestras de control. A partir de estos datos, se calculará los valores porcentuales de inhibición para cada concentración de ensayo. Estos porcentajes se representarán en un gráfico en función de la concentración y, a continuación, se utilizarán procedimientos estadísticos para calcular los valores EC_X. Los límites de confianza ($p = 0,95$) para el valor EC_X calculado se hallarán también utilizando procedimientos estándar (10) (11) (12).

Las sustancias de ensayo que contengan grandes cantidades de nitrógeno pueden contribuir a las cantidades de nitratos formados durante el ensayo. Si estas sustancias se ensayan a concentraciones altas (por ejemplo, sustancias químicas que esté previsto utilizar en aplicaciones repetidas), deben incluirse en el ensayo muestras de control apropiadas (es decir, muestra de suelo más sustancia de ensayo, pero sin harina vegetal). Los datos de estas muestras de control deben tenerse en cuenta en los cálculos de la EC_X.

▼B

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cuando se evalúen los resultados de los ensayos con productos agroquímicos y la diferencia en los índices de formación de nitratos entre el tratamiento más bajo (es decir, la concentración máxima prevista) y la muestra de control no supere el 25 % en cualquier tiempo de muestreo a partir del 28º día, el producto podrá considerarse que no tiene influencia a largo plazo en la transformación de nitrógeno en el suelo. Cuando se evalúen los resultados de ensayos con sustancias químicas no agrícolas, se utilizarán los valores EC_{50}, EC_{25} y/o EC_{10}.

3. **INFORME**

El informe del ensayo debe incluir los datos siguientes:

Identificación completa del suelo utilizado, incluyendo:

— referencia geográfica del lugar (latitud y longitud),

— información sobre la historia del lugar (es decir, cubierta vegetal, tratamientos con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos, contaminación accidental, etc.),

— tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.),

— profundidad de muestreo (cm),

— contenido de arena/limo/arcilla (% peso seco),

— pH (en agua),

— contenido de carbono orgánico (% peso seco),

— contenido de nitrógeno (% peso seco),

— concentración inicial de nitratos (mg nitratos/kg peso seco),

— capacidad de intercambio de cationes (mmol/kg),

— biomasa microbiana en porcentaje del carbono orgánico total,

— referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro,

— toda la información sobre la recogida y almacenamiento de las muestras de suelo,

— datos de la preincubación del suelo, si procede.

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,

— identificación química, en su caso, incluyendo fórmula estructural, pureza (es decir, en el caso de los productos fitosanitarios, el porcentaje de principio activo) y contenido de nitrógeno.

Sustrato:

— origen del sustrato,

— composición (es decir, harina de alfalfa, harina de alfalfa-hierba-forraje verde),

— contenido de carbono y nitrógeno (% peso seco),

— tamaño del tamiz (mm).

▼B

Condiciones de ensayo:

— información sobre la adición al suelo del sustrato orgánico,

— número de concentraciones de la sustancia de ensayo utilizada y, en su caso, justificación de las concentraciones seleccionadas,

— datos de la aplicación de la sustancia de ensayo al suelo,

— temperatura de incubación,

— contenido de humedad al principio y durante el ensayo,

— método de incubación del suelo utilizado (es decir, en una muestra única o en una serie de submuestras separadas),

— número de ejemplares,

— tiempos de muestreo,

— método utilizado para la extracción de nitratos del suelo.

Resultados:

— procedimiento analítico y equipo empleado para analizar los nitratos,

— tabla de resultados incluyendo los distintos valores de las mediciones de nitratos y los valores medios,

— variación entre los ejemplares de las muestras tratadas y la muestras de control,

— explicación de las correcciones efectuadas en los cálculos, si procede,

— variación porcentual de los índices de formación de nitratos en cada tiempo de muestreo o, si procede, el valor EC_{50} con un límite de confianza del 95 %, otros valores EC_x (es decir, EC_{25} o EC_{10}) con intervalos de confianza, y una gráfica de la curva dosis-respuesta,

— tratamiento estadístico de los resultados,

— cualquier información u observación complementaria importante para interpretar los resultados.

4. **REFERENCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality -Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBONO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 217 (2000).

1.1. INTRODUCCIÓN

En el presente método de ensayo se describe un método de laboratorio diseñado para investigar los efectos potenciales a largo plazo de una exposición única a productos fitosanitarios y posiblemente otras sustancias químicas sobre la actividad de transformación del carbono por los microorganismos del suelo. El ensayo se basa principalmente en las recomendaciones de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (1). Sin embargo, se han tenido en cuenta otras directrices, como las del Biologische Bundesanstalt (2) de Alemania, la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (3) y la SETAC (4). En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (5) se alcanzó un acuerdo sobre el número y tipos de suelos que deben utilizarse en estos ensayos. Las recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de suelo se basan en un documento orientativo de la ISO (6) y en las recomendaciones del seminario de Belgirate.

En la valoración y evaluación de las características de las sustancias de ensayo, puede resultar necesaria la determinación de los efectos de la actividad microbiana en el suelo, por ejemplo, cuando se requieran datos sobre los posibles efectos secundarios de los productos fitosanitarios en la microflora del suelo o cuando sea previsible la exposición de los microorganismos del suelo a productos químicos distintos de los fitosanitarios. El ensayo de transformación del carbono se lleva a cabo para determinar los efectos de estos productos químicos en la microflora del suelo. Si se ensayan productos agroquímicos (por ejemplo, productos fitosanitarios, abonos y productos químicos para la silvicultura), se llevarán a cabo tanto ensayos de transformación del carbono como del nitrógeno. Si se trata de productos no agroquímicos, es suficiente el ensayo de transformación del nitrógeno. Sin embargo, si los valores EC_{50} del ensayo de transformación del nitrógeno de estos productos químicos se sitúan dentro del intervalo encontrado para los inhibidores de la nitrificación disponibles en el comercio (por ejemplo, la nitrapirina), puede hacerse un ensayo de transformación del carbono para obtener más información.

Los suelos están formados por componentes vivos y no vivos que se dan en mezclas complejas y heterogéneas. Los microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y transformación de la materia orgánica en los suelos fértiles. Existen muchas especies que contribuyen de diversas maneras a la fertilidad del suelo. Cualquier interferencia a largo plazo en estos procesos bioquímicos podría perturbar el ciclo de los nutrientes y alterar la fertilidad del suelo. La transformación del carbono y del nitrógeno se da en todos los suelos fértiles. Aunque las comunidades microbianas responsables de estos procesos difieren de unos suelos a otros, las rutas de transformación son esencialmente las mismas.

▼B

Este método de ensayo está pensado para detectar los efectos negativos a largo plazo de una sustancia en el proceso de transformación del carbono en los suelos aerobios de superficie. El ensayo es sensible a alteraciones de la envergadura y la actividad de las comunidades microbianas responsables de la transformación del carbono, al someterlas a estrés químico y privación de carbono. Se utiliza un suelo arenoso con bajo contenido de materia orgánica. Se trata este suelo con la sustancia de ensayo y se incuba en condiciones que permitan un rápido metabolismo microbiano. En estas condiciones, las fuentes de carbono de fácil obtención se agotan rápidamente en el suelo. Este hecho ocasiona una privación de carbono que causa la muerte de las células microbianas e induce el letargo y/o la esporulación. Si el ensayo se prolonga durante más de 28 días, puede medirse la suma de estas reacciones en controles (de suelo no tratado) como pérdida progresiva de biomasa microbiana metabólicamente activa (7). Si la biomasa del suelo sometido a estrés de carbono, en las condiciones del ensayo, se ve afectada por la presencia de un producto químico, puede que no regrese al mismo nivel que el control. Por ello, las perturbaciones causadas por la sustancia de ensayo en cualquier momento de la realización de este persistirán frecuentemente hasta su finalización.

Los ensayos a partir de los cuales se desarrolló este método estaban pensados principalmente para sustancias respecto a las cuales puede preverse la cantidad que llegará al suelo. Este es el caso, por ejemplo, de los productos fitosanitarios, cuyo índice de aplicación en el campo es conocido. Para los productos agroquímicos, es suficiente el ensayo de dos dosis con arreglo al índice de aplicación estimado o previsto. Los productos agroquímicos pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados. Sin embargo, el ensayo no se limita a los productos químicos con concentraciones en el medio ambiente previsibles. Cambiando tanto las cantidades de la sustancia de ensayo aplicada al suelo como la manera en que se evalúan los datos, el ensayo puede usarse también para productos químicos de los cuales se desconozca la cantidad que llegará al suelo. De este modo, en el caso de los productos no agroquímicos, se determinan los efectos de una serie de concentraciones en la transformación del carbono. A continuación, se utilizan los datos de estos ensayos para trazar una curva dosis-respuesta y calcular los valores EC, donde x es el porcentaje de efecto definido.

1.2 DEFINICIONES

Transformación del carbono: es la degradación por microorganismos de la materia orgánica hasta formar dióxido de carbono como producto final.

EC_X (concentración efectiva): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un porcentaje x de inhibición de la transformación del carbono en dióxido de carbono.

EC_{50} (concentración efectiva mediana): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un 50 % de inhibición de la transformación del carbono en dióxido de carbono.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

▼B

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se trata parte del suelo tamizado con la sustancia de ensayo y se deja otra sin tratar (control). Cuando se ensayen productos agroquímicos, se recomienda un mínimo de dos concentraciones de ensayo, que deberán elegirse en relación con la concentración más alta prevista sobre el terreno. Después de 0, 7, 14 y 28 días de incubación, se mezclarán muestras de suelos tratados y de control con glucosa y se medirán las tasas de respiración inducidas por la glucosa durante 12 horas consecutivas. Las tasas de respiración se expresan como dióxido de carbono liberado (mg dióxido de carbono/kg suelo seco/h) u oxígeno consumido (mg oxígeno/kg suelo/h). Se comparará la tasa de respiración en las muestras de suelo tratado con la de control y se calculará el porcentaje de desviación respecto a esta. Todos los ensayos tendrán una duración mínima de 28 días. Si, al 28º día, la diferencia entre los suelos tratados y los no tratados es igual o superior al 25 %, se continuarán las mediciones a intervalos de 14 días hasta un máximo de 100 días. Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se añadirá a las muestras de suelo una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo y se medirán al cabo de 28 días las tasas de respiración inducidas por glucosa (es decir, la media de las cantidades de dióxido de carbono formado u oxígeno consumido). Se analizarán los resultados de los ensayos con una serie de concentraciones utilizando un modelo de regresión y se calcularán los valores EC_X (es decir, EC_{50}, EC_{25} y/o EC_{10}). Véanse las definiciones.

1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Las evaluaciones de los resultados de los ensayos con productos agroquímicos se basan en diferencias relativamente pequeñas (de un valor medio de ± 25 %) entre el dióxido de carbono liberado o el oxígeno consumido en (o por) las muestras de suelo tratado y de control, por lo que grandes variaciones en las muestras de control pueden dar lugar a resultados falsos. Por este motivo, la variación entre muestras de control en paralelo deberá ser inferior al ± 15 %.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1 **Equipo**

Se utilizarán recipientes de ensayo hechos de material químicamente inerte. Estos recipientes deberán ser de capacidad adecuada de acuerdo con el procedimiento utilizado para la incubación de suelos, es decir, incubación en una muestra única o en una serie de muestras separadas (véase el punto 1.7.1.2). Hay que procurar reducir al mínimo la pérdida de agua y permitir el intercambio de gas durante el ensayo (por ejemplo, pueden cubrirse los recipientes con láminas de polietileno perforado). Cuando se ensayen sustancias volátiles, deberán usarse recipientes sellables y herméticos cuyo tamaño sea tal que aproximadamente un cuarto de su volumen esté ocupado por la muestra de suelo.

Para la determinación de la respiración inducida por glucosa, se precisarán sistemas e instrumentos de incubación que permitan medir la producción de dióxido de carbono o el consumo de oxígeno. Se encontrarán ejemplos de este tipo de sistemas e instrumentos en la bibliografía, referencias (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Selección y número de suelos**

Se utilizará un único suelo cuyas características recomendadas serán las siguientes:

— contenido de arena: no inferior al 50 % ni superior al 75 %,

▼B

— pH: 5,5-7,5,

— contenido de carbono orgánico: 0,5-1,5 %

— deberá medirse la masa microbiana (12)(13), cuyo contenido de carbono deberá ser al menos el 1 % del total de carbono orgánico en el suelo.

En la mayoría de los casos, un suelo de estas características representa la situación más desfavorable, ya que la adsorción de la sustancia química de ensayo es mínima y su disponibilidad para la microflora es máxima. Por lo tanto, no son necesarios, por lo general, ensayos de otros suelos. Sin embargo, en algunas circunstancias, por ejemplo cuando la sustancia de ensayo esté indicada principalmente para determinados suelos, como los suelos forestales ácidos, o en el caso de productos químicos cargados electrostáticamente, puede resultar necesario utilizar un suelo adicional.

1.6.3 **Recogida y conservación de muestras de suelo**

1.6.3.1 *Recogida*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del lugar donde se haya recogido el suelo de ensayo. En particular, localización precisa, cubierta vegetal, fechas de tratamiento con productos fitosanitarios, con abonos orgánicos e inorgánicos, adición de materiales biológicos o contaminación accidental. El lugar elegido para la recogida de suelo tiene que ser tal que permita un uso a largo plazo. Se consideran adecuados los pastos permanentes, los campos con cosechas anuales de cereales (excepto el maíz) o los abonos verdes sembrados densamente. El lugar donde se recojan las muestras no deberá haber sido tratado con productos fitosanitarios durante un mínimo de un año antes de la recogida de estas. Además, no deberá haberse aplicado ningún abono orgánico durante al menos seis meses. El uso de abonos minerales solo será aceptable cuando responda a las necesidades del cultivo, y en ese caso no deberán tomarse muestras hasta transcurridos, al menos, tres meses desde la aplicación del abono. Deberá evitarse el uso de suelo tratado con abonos de efectos biocidas conocidos (por ejemplo, cianamida de calcio).

Deberá evitarse la toma de muestras durante o inmediatamente después de períodos prolongados (de más de 30 días) de sequía o encharcamiento. En el caso de los suelos arados, deberán tomarse muestras a una profundidad de 0 a 20 cm. Cuando se trate de pastizales u otros suelos que no se aren durante períodos más largos (al menos un ciclo de cultivo), la profundidad máxima del muestreo podrá ser ligeramente superior a 20 cm (por ejemplo, 25 cm). Las muestras de suelo se transportarán en recipientes y en condiciones de temperatura que garanticen que las propiedades iniciales del suelo no se alteren significativamente.

1.6.3.2 *Conservación*

Es preferible el uso de muestras de suelo recién recogidas. Si no se puede evitar el almacenamiento en el laboratorio, las muestras de suelo podrán guardarse en la oscuridad a 4 ± 2 ºC durante un máximo de tres meses. Durante el almacenamiento, deberá asegurarse el mantenimiento de unas condiciones aerobias. Si se recogen muestras de suelo de zonas que estén heladas durante, al menos, tres meses al año, podrá considerarse la posibilidad de almacenarlas durante seis meses a - 18 ºC. Se medirá la biomasa microbiana de las muestras almacenadas antes de cada experimento. La cantidad de carbono en la biomasa deberá ser como mínimo el 1 % del total de carbono orgánico de la muestra de suelo (véase el punto 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Manipulación y preparación del suelo para el ensayo**

1.6.4.1 *Preincubación*

Cuando las muestras de suelo hayan estado almacenadas (véanse los puntos 1.6.4.2 y 1.7.1.3), se recomienda preincubar durante un período de entre 2 y 28 días. La temperatura y el contenido de humedad del suelo durante la preincubación deberán ser semejantes a las que se den durante el ensayo (véanse los puntos 1.6.4.2 y 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Características fisicoquímicas*

Se separarán manualmente los objetos grandes (por ejemplo, piedras, trozos de plantas, etc.) de la muestra de suelo y, a continuación, se tamizará la muestra por vía húmeda sin secar en exceso para obtener un tamaño de las partículas no superior a 2 mm. Deberá ajustarse el contenido de humedad de la muestra con agua destilada o desionizada para llegar a un valor entre el 40 % y el 60 % de la capacidad de retención de agua máxima.

1.6.5 **Preparación de la sustancia de ensayo para la aplicación al suelo**

La sustancia de ensayo se aplica normalmente utilizando un vehículo. El vehículo podrá ser agua (para las sustancias solubles en el agua) o un sólido inerte como arena fina de cuarzo (tamaño de las partículas: 0,1-0,5 mm). Se evitarán los vehículos líquidos distintos del agua (por ejemplo, disolventes orgánicos como la acetona o el cloroformo), porque pueden dañar la microflora. Si se usa arena como vehículo, podrá recubrirse con la sustancia de ensayo disuelta o suspendida en un disolvente apropiado. En tal caso, deberá eliminarse el disolvente por evaporación antes de mezclarse con la muestra de suelo. Para una distribución óptima de la sustancia de ensayo en el suelo, se recomienda una proporción de 10 g de arena por kilo de suelo (peso en seco). Las muestras de control se tratarán solo con la cantidad equivalente de agua y/o arena de cuarzo.

Cuando se ensayen sustancias químicas volátiles, deberán evitarse las pérdidas durante el tratamiento y se procurará conseguir una distribución homogénea en la muestra de suelo (por ejemplo, deberá inyectarse la sustancia de ensayo en la muestra en varios sitios).

1.6.6 **Concentraciones de ensayo**

Si se someten a ensayo productos fitosanitarios u otros productos químicos cuyas concentraciones en el medio ambiente sean predecibles, deberán utilizarse al menos dos concentraciones. La concentración más baja corresponderá, al menos, a la cantidad máxima que se prevé que llegue al suelo en la práctica, y la concentración más alta será un múltiplo de la concentración más baja. Las concentraciones de la sustancia de ensayo añadida al suelo se calcularán suponiendo una incorporación uniforme hasta una profundidad de 5 cm y una densidad aparente del suelo de 1,5. Para los productos agroquímicos que se aplican directamente al suelo o para las sustancias químicas para las cuales puede predecirse la cantidad que llega al suelo, las concentraciones de ensayo recomendadas son la concentración ambiental prevista (PEC) y cinco veces esa concentración. Las sustancias destinadas a ser aplicadas a los suelos varias veces en la misma temporada se ensayarán a las concentraciones resultantes de multiplicar la PEC por el número máximo de aplicaciones previsto. Sin embargo, la concentración máxima ensayada no deberá superar diez veces el índice máximo para una aplicación.

Si se ensayan productos no agroquímicos, se empleará una serie geométrica de, al menos, cinco concentraciones. Las concentraciones ensayadas deberán cubrir el intervalo necesario para determinar los valores EC_X.

▼B

1.7 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.7.1 **Condiciones de exposición**

1.7.1.1 *Tratamiento y control*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en tres partes de igual peso. Dos partes se mezclarán con el vehículo que contenga el producto, y la otra, con el vehículo sin el producto (control). Se recomienda un mínimo de tres ejemplares para ambos tipos de muestras, las tratadas y las no tratadas. Cuando se ensayen productos no agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en seis partes de igual peso. Cinco de las muestras se mezclarán con el vehículo que contenga la sustancia de ensayo, y la sexta, con el vehículo sin la sustancia. Se recomienda preparar tres ejemplares tanto para las muestras tratadas como las de control. Deberá procurarse una distribución homogénea de la sustancia de ensayo en las muestras tratadas. Durante la mezcla, se evitará la compactación de la muestra o la formación de grumos.

1.7.1.2 *Incubación de las muestras de suelo*

La incubación de las muestras de suelo puede hacerse de dos maneras: como dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, o como una serie de submuestras de igual tamaño de suelo tratado, por una parte, y de suelo no tratado, por otra. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, solo deberá hacerse el ensayo con una serie de submuestras separadas. Cuando las muestras de suelo se incuben en una muestra única, se prepararán grandes cantidades de suelo tratado y no tratado, y se tomarán las submuestras que deban analizarse según se necesite a lo largo del ensayo. La cantidad preparada inicialmente para las muestras tratadas y para las de control dependerá del tamaño de las submuestras, el número de ejemplares utilizados para el análisis y el número máximo previsto de períodos de muestreo. Deberán mezclarse bien las muestras de suelo incubadas como muestra única antes de preparar las submuestras. Cuando la incubación se haga en una serie muestras separadas, se dividirán las dos muestras, de suelo tratado y de suelo no tratado, en el número de submuestras requerido, y estas se utilizarán según se necesite. En los experimentos en los que puedan preverse más de dos tiempos de muestreo, habrán de prepararse las submuestras suficientes, teniendo en cuenta los ejemplares y los tiempos de muestreo. Deberán incubarse, al menos, tres ejemplares de las muestras de ensayo en condiciones aerobias (véase el punto 1.7.1.1). Durante todos los ensayos, se utilizarán recipientes adecuados con suficiente espacio libre para evitar la aparición de condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, solo deberá realizarse el ensayo con una serie de submuestras separadas.

1.7.1.3 *Condiciones y duración del ensayo*

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura ambiente de 20± 2 ºC. El contenido de humedad de las muestras se mantendrá durante el ensayo entre el 40 % y el 60 % de la capacidad de retención de agua máxima del suelo (véase el punto 1.6.4.2) con una variación máxima del ± 5 %. Podrá añadirse agua destilada y desionizada según se necesite.

La duración mínima del ensayo será de 28 días. Si se están ensayando productos agroquímicos, se compararán las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en las muestras tratada y de control. Si difieren en más del 25 % al 28º día, se continuará el ensayo hasta que se obtenga una diferencia igual o menor al 25 % o bien durante un máximo de 100 días. En el caso de los productos no agroquímicos, se pondrá fina al ensayo a los 28 días. Al 28º día, se determinarán las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en las muestras tratada y de control y se calcularán los valores EC_X.

▼B

1.7.2 **Toma de muestras y análisis de suelos**

1.7.2.1 *Calendario de toma de muestras*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, se hará el análisis de tasas de respiración inducida por glucosa en las muestras de suelo los días 0, 7, 14 y 28. Cuando se necesite un ensayo prolongado, se efectuarán nuevas mediciones a intervalos de 14 días a partir del 28º día.

Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se utilizarán como mínimo cinco concentraciones de ensayo y se hará el análisis de la respiración inducida por glucosa en las muestras de suelo al principio (día 0) y al final del período de exposición (28 días). Si se considera necesario, podrá añadirse una medición intermedia, por ejemplo, al séptimo día. Se utilizarán los datos obtenidos al 28º día para hallar el valor EC_X de la sustancia química. Si se desea, podrán utilizarse los datos de las muestras de control obtenidos el día 0 para estimar las cantidades iniciales de biomasa microbiana metabólicamente activa en el suelo (12).

1.7.2.2 *Medida de las tasas de respiración inducida por glucosa*

Se determinará la tasa de respiración inducida por glucosa en cada ejemplar de muestra tratada y de control en cada momento de muestreo. Se mezclarán las muestras de suelo con una cantidad de glucosa suficiente para suscitar una respuesta respiratoria máxima inmediata. Dicha cantidad de glucosa necesaria para suscitar una respuesta respiratoria máxima en un suelo dado puede determinarse en un ensayo preliminar utilizando una serie de concentraciones de glucosa (14). Sin embargo, en el caso de suelos arenosos con 0,5-1,5 % de carbono orgánico, suelen resultar suficientes de 2 000 mg a 4 000 mg de glucosa por kg de suelo (peso en seco). Es posible obtener un polvo mezclando la glucosa con arena de cuarzo limpia (10 g de arena/kg de suelo, peso en seco) y mezclarlo con el suelo de manera homogénea.

Se incubarán las muestras de suelo enmendadas con glucosa en un aparato adecuado para medir las tasas de respiración continuamente, cada hora o cada dos horas (véase el punto 1.6.1) a 20 ± 2 ºC. Se medirá el dióxido de carbono liberado o el oxígeno consumido durante 12 horas consecutivas, iniciándose las medidas lo antes posible, es decir, de 1 a 2 horas después de añadido el suplemento de glucosa. Se medirán las cantidades totales de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido durante las 12 horas y se determinarán las tasas de respiración promedio.

2 **RESULTADOS**

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Si se trata de productos agroquímicos, deberán registrarse las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en cada ejemplar de muestra de suelo, tabulándose además los valores promedio de todos los ejemplares. Se evaluarán los resultados mediante métodos estadísticos apropiados y generalmente aceptables (por ejemplo, prueba F, nivel de significación del 5 %). Las tasas de respiración inducida por glucosa se expresan en mg de dióxido de carbono/kg suelo, peso en seco/h o en mg oxígeno/suelo, peso en seco/h. Se comparará la tasa promedio de formación de dióxido de carbono o la tasa promedio de consumo de oxígeno en cada tratamiento con la de control, calculándose la desviación porcentual con respecto al control.

▼B

Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se determinarán las cantidades de dióxido de carbono liberadas o de oxígeno consumidas por cada ejemplar y se trazará una curva dosis-respuesta para estimar los valores EC_x. Se compararán las tasas de respiración inducida por glucosa (es decir, mg de dióxido de carbono/kg suelo, peso en seco/h o mg oxígeno/suelo, peso en seco/h) que presenten las muestras tratadas transcurridos 28 días con las que presenten las muestras de control. A partir de estos datos, se calcularán los valores porcentuales de inhibición para cada concentración de ensayo. Se representarán gráficamente estos porcentajes frente a la concentración, utilizándose luego procedimientos estadísticos para calcular los valores EC_X. Utilizando asimismo procedimientos estándar, se determinarán los limites de confianza (p = 0,95) para los EC_X calculados (10)-(11)(12).

2.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cuando se evalúen los resultados de los ensayos con productos agroquímicos y la diferencia en las tasas de respiración entre el tratamiento más bajo (es decir, la concentración máxima prevista) y la muestra de control no supere el 25 % en ningún momento de muestreo a partir del 28^2 día, podrá considerarse que el producto no tiene influencia a largo plazo en la transformación de carbono en el suelo. Cuando se evalúen los resultados de ensayos con productos no agroquímicos, se utilizarán los valores EC_{50}, EC_{25} y/o EC_{10}

3 **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Identificación completa del suelo utilizado, incluyendo:

— referencia geográfica del lugar (latitud y longitud),

— información sobre la historia del lugar (es decir, cubierta vegetal, tratamientos con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos, contaminación accidental, etc.),

— tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.),

— profundidad de muestreo (cm),

— contenido de arena/limo/arcilla (% peso seco),

— pH (en agua),

— contenido de carbono orgánico (% peso seco),

— contenido de nitrógeno (% peso seco),

— capacidad de intercambio de cationes (mmol/kg),

— biomasa microbiana inicial en porcentaje del carbono orgánico total,

— referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro,

— toda la información sobre la recogida y almacenamiento de las muestras de suelo,

— datos de la preincubación del suelo, si procede.

▼B

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,

— identificación química, en su caso, incluyendo fórmula estructural, pureza (es decir, en el caso de los productos fitosanitarios, el porcentaje de principio activo) y contenido de nitrógeno.

Condiciones de ensayo:

— información sobre la adición al suelo de sustrato orgánico,

— número de concentraciones de la sustancia de ensayo utilizadas y, en su caso, justificación de las concentraciones seleccionadas,

— datos de la aplicación de la sustancia de ensayo al suelo,

— temperatura de incubación,

— contenido de humedad al principio y durante el ensayo,

— método de incubación del suelo utilizado (es decir, muestra única o serie de submuestras separadas),

— número de ejemplares,

— tiempos de muestreo.

Resultados:

— método y equipo utilizados para medir las tasas de respiración,

— datos tabulados, incluyendo los distintos valores y los valores promedio de las cantidades de dióxido de carbono u oxígeno,

— variación entre los ejemplares de las muestras tratadas y las muestras de control,

— explicación de la correcciones efectuadas en los cálculos, si procede,

— variación porcentual de las tasas de respiración inducida por glucosa en cada momento de muestreo o, si procede, el valor EC_{50} con un límite de confianza del 95 %, otros valores EC_x (es decir, EC_{25} o EC_{10}) con intervalos de confianza, y una gráfica de la curva dosis-respuesta,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede,

— cualquier información u observación complementaria de interés para la interpretación de los resultados.

4 **REFERENCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3:45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph Nº 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41:831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluB von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN EL SUELO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 307 (2002).

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método se basa en las actuales directrices (1)(2)(3)(4)(5)-(6)(7)(8)(9). El método está pensado para evaluar la transformación aerobia y anaerobia de las sustancias químicas en el suelo. Con los experimentos se pretende determinar: i) la tasa de transformación de la sustancia de ensayo, y ii) la naturaleza y las tasas de formación y disminución de los productos de transformación a los que pueden estar expuestos los vegetales y los organismos del suelo. Se precisa de dichos estudios para las sustancias químicas que se aplican directamente al suelo o es probable que alcancen el medio edáfico. Los resultados de los estudios pueden utilizarse igualmente para elaborar protocolos de muestreo y análisis para estudios de campo afines.

Por regla general, para evaluar las vías de transformación bastará efectuar estudios aerobios y anaerobios con un tipo de suelo (8)(10)(l 1). Las tasas de transformación, sin embargo, deberán determinarse por lo menos en otros tres suelos (8)(10).

En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (10) se alcanzó un acuerdo, en particular, sobre el número y tipos de suelos que deben utilizarse en estos ensayos. Los tipos de suelos sometidos a ensayo deben ser representativos de las condiciones ambientales en las que tendrá lugar el uso o la liberación. Por ejemplo, las sustancias químicas que vayan a liberarse en climas tropicales o subtropicales deben ensayarse en ferralsoles y nitosoles (sistema FAO). Dicho seminario formuló asimismo recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de suelos (15). También se examina en este método el uso de suelos de (arroz) paddy.

1.2 DEFINICIONES

Sustancia de ensayo: cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

Productos de transformación: todas las sustancias resultantes de las reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia de ensayo, incluido el CO_2 y los productos que se encuentran en los residuos ligados.

Residuos ligados: compuestos del suelo, la planta o el animal que persisten en la matriz en forma de sustancia original o de sus productos de transformación/metabolitos tras la extracción. El método de extracción no debe modificar sustancialmente ni los propios compuestos ni la estructura de la matriz. La naturaleza del vínculo puede aclararse parcialmente mediante métodos de extracción que alteren la matriz y técnicas analíticas sofisticadas. Así por ejemplo, hasta la fecha se han identificado de esta manera enlaces covalentes, iónicos y de sorción, así como atrapamientos. En general, la formación de residuos ligados reduce de manera significativa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (12) [modificado de IUPAC 1984 (13)].

Transformación aerobia: reacciones que se producen en presencia de oxígeno molecular (14).

▼B

Transformación anaerobia: reacciones que se producen en ausencia de oxígeno molecular (14).

Suelo: mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado, animados por pequeños organismos (principalmente microorganismos). El suelo puede manipularse en dos estados:

a) no perturbado, tal como se ha desarrollado en el tiempo, en capas características de diversos tipos de suelo;

b) perturbado, como suele encontrarse en los campos cultivables o como se presenta cuando se toman muestras mediante excavación para utilizarlas en el presente método de ensayo (14).

Mineralización: degradación completa de un compuesto orgánico a CO_2 y H_2O en condiciones aerobias y a CH_4, CO_2 y H_2O en condiciones anaerobias. En el contexto del presente método, cuando se utiliza un compuesto marcado con ^{14}C, mineralización significa la amplia degradación durante la que se oxida un átomo de carbono marcado con liberación de la cantidad apropiada de $^{14}CO_2$ (14).

Semivida: to, s, es el tiempo que tarda la transformación del 50 % de una sustancia de ensayo cuando puede describirse dicha transformación mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración.

DT_{50} (tiempo de desaparición 50): es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 50 %; es distinto de la semivida $t_{0,5}$ cuando la transformación no sigue una cinética de primer orden.

DT_{75} (tiempo de desaparición 75): es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 75 %.

DT_{90} (tiempo de desaparición 90): es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 90 %.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Deberán utilizarse sustancias de referencia para la caracterización y/o identificación de los productos de transformación por métodos espectroscópicos o cromatográficos.

1.4 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método es aplicable a todas las sustancias químicas (no marcadas o marcadas radiactivamente) para las que se dispone de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles, no volátiles, solubles en agua o insolubles en agua. El ensayo no deberá aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del suelo (por ejemplo, fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en el suelo en las condiciones experimentales del presente ensayo.

▼B

1.5 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la tasa de transformación podrá utilizarse una sustancia de ensayo marcada o no marcada. Para estudiar la vía de transformación y establecer un balance de materia se requiere material marcado. Se recomienda el marcado con ^{14}C, pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H o ^{32}P. El marcador deberá ubicarse, en la medida de lo posible, en la parte o las partes más estables de la molécula ([1]). La pureza de la sustancia de ensayo deberá ser de al menos el 95 %.

Antes de realizar un ensayo sobre la transformación aerobia o anaerobia en el suelo, deberá contarse con la siguiente información relativa a la sustancia de ensayo.

a) solubilidad en agua (Método A.6);

b) solubilidad en disolventes orgánicos;

c) presión de vapor (Método A.4) y constante de la ley de Henry;

d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (Método A.8);

e) estabilidad química en la oscuridad (hidrólisis) (Método C.7);

f) pK_a si una molécula es susceptible de protonación o desprotonación [Directriz 112 de la OCDE] (16).

También pueden resultar de utilidad los datos sobre la toxicidad de la sustancia de ensayo para los microorganismos del suelo [Métodos de ensayo C.21 y C.22] (16).

Deberá contarse con métodos analíticos (incluidos métodos de extracción y depuración) para la cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación.

1.6 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se tratan las muestras de suelo con la sustancia de ensayo y se incuban en la oscuridad en un matraz biométrico o en sistemas de flujo en condiciones de laboratorio controladas (a humedad del suelo y temperatura constantes). A intervalos de tiempo adecuados, se extraen muestras del suelo y se analizan en ellas la sustancia original y los productos de transformación. También se recogen los productos volátiles para su análisis con los dispositivos de absorción adecuados. Utilizando material marcado con C es posible medir las diversas tasas de mineralización de la sustancia de ensayo atrapando el $^{14}CO_2$ resultante y establecer un balance de materia, incluyendo la formación de residuos ligados al suelo.

1.7 CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1 **Recuperación**

La extracción y el análisis de muestras de suelo cuando menos duplicadas inmediatamente después de la adición de la sustancia de ensayo dan una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia de ensayo. Los valores de recuperación para fases posteriores del experimento los dan los balances másicos respectivos. Dichos valores deberán situarse entre el 90 % y el 110 % para sustancias químicas marcadas (8) y entre el 70 % y el 110 % para sustancias químicas no marcadas (3).

([1]) Por ejemplo, si la sustancia de ensayo contiene un anillo, es preciso marcar ese anillo: si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de transformación.

▼B

1.7.2 **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método analítico (excluida la eficiencia de extracción inicial) para cuantificar la sustancia de ensayo y los productos de transformación puede comprobarse realizando un análisis por duplicado del mismo extracto de suelo incubado durante tiempo suficiente para que se formen productos de transformación.

El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia de ensayo y de los productos de transformación deberá alcanzar, como mínimo, el menor de los siguientes valores: 0,01 $mg\text{-}kg^{-1}$ de suelo (como sustancia de ensayo) o un 1 % de la dosis aplicada. También deberá especificarse el límite de cuantificación (LOQ).

1.7.3 **Exactitud de los datos de transformación**

El análisis de regresión de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo facilita la información apropiada sobre, la fiabilidad de la curva de transformación y permite calcular los límites de confianza de las semividas (en el caso de la cinética de pseudo primer orden) o los valores DT_{50} y, si procede, DT_{75} y DT_{90}.

1.8 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.8.1 **Equipos y reactivos químicos**

Los sistemas de incubación consisten en sistemas cerrados estáticos o sistemas de flujo adecuados (7) (17). En las figuras 1 y 2 se muestran ejemplos de, respectivamente, aparatos de flujo de incubación de suelo y matraces biométricos adecuados. Los dos tipos de sistema de incubación tienen sus ventajas y sus limitaciones (7) (17).

Se precisa el equipo estándar de laboratorio y, en particular:

— instrumentos analíticos tales como equipos GLC, HPLC, TLC, incluidos los sistemas de detección adecuados para el análisis de sustancias marcadas o no marcadas o el método de dilución isotópica inversa,

— instrumentos de identificación (por ejemplo, MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, etc.),

— contador de centelleo de líquidos,

— cámara de combustión oxidante de material radiactivo,

— centrifugadora,

— aparato de extracción (por ejemplo, tubos de centrifugación para extracción en frío y aparato Soxhlet para extracción continua a reflujo),

— instrumental para concentrar soluciones y extractos (por ejemplo, evaporador rotatorio),

— baño maria,

— dispositivo mezclador mecánico (por ejemplo, amasadora, mezcladora rotatoria).

▼B

Entre los reactivos químicos figuran, por ejemplo:

— NaOH, pureza de grado analítico, 2 mol dm^{-3}, u otra base apropiada (por ejemplo, KOH, etanolamina),

— H_2SO_4, pureza de grado analítico, 0,05 mol dm^{-3}

— glicol etileno, pureza de grado analítico,

— materiales sólidos de absorción, tales como cal sodada y piezas de poliuretano,

— disolventes orgánicos, pureza de grado analítico, tales como acetona, metanol, etc.,

— líquido de centelleo.

1.8.2 **Aplicación de la sustancia de ensayo**

Para incorporarla al suelo y distribuirla en él, podrá disolverse la sustancia de ensayo en agua (desionizada o destilada) o, si resulta necesario, en cantidades mínimas de acetona u otro disolvente orgánico (6) en el que la sustancia de ensayo sea suficientemente soluble y estable. No obstante, la cantidad de disolvente seleccionada no deberá tener una influencia significativa sobre la actividad microbiana del suelo (véanse los puntos 1.5 y 1.9.2-1.9.3. Deberá evitarse el uso de disolventes inhibidores de la actividad microbiana, tales como cloroformo, diclorometano y otros disolventes halogenados.

Podrá incorporarse asimismo la sustancia de ensayo en forma sólida, por ejemplo, mezclada con arena de cuarzo (6) o en una pequeña submuestra del suelo sometido a ensayo que se haya secado al aire y esterilizado. Si se incorpora la sustancia de ensayo utilizando un disolvente, deberá permitirse que este se evapore antes de incorporar la submuestra a la muestra de suelo original no estéril.

Para las sustancias químicas ordinarias, cuya principal vía de entrada en el suelo es a través de los lodos de depuración o la actividad agraria, deberá incorporarse primero la sustancia de ensayo al lodo, que luego se introducirá en la muestra de suelo, (véanse los puntos 1.9.2 y 1.9.3).

No se recomienda la utilización rutinaria de productos formulados. No obstante, su utilización podría constituir una alternativa apropiada, por ejemplo, en el caso de sustancias de ensayo poco solubles.

1.8.3 **Suelos**

1.8.3.1 *Selección de suelos*

Para determinar la vía de transformación, podrá utilizarse un suelo representativo; se recomienda un suelo franco arenoso o franco limoso o franco o arenoso franco [según la clasificación de FAO y USDA (18)] con un pH de 5,5-8,0, un contenido de carbono orgánico de 0,5-2,5 % y una biomasa microbiana de al menos 1 % del carbono orgánico total (10).

Para estudios de tasa de transformación deberán utilizarse al menos tres suelos adicionales representativos de la gama de suelos relevante. Estos suelos deben variar en cuanto a contenido de carbono orgánico, pH, contenido de arcilla y biomasa microbiana (10).

▼B

Deberán caracterizarse todos los suelos, cuando menos, en cuanto a textura (% arena, % limo, % arcilla) [según la clasificación de FAO y USDA (18)], pH, capacidad de intercambio de cationes, carbono orgánico, densidad aparente, característica de retención de agua ([1]) y biomasa microbiana (solo para estudios aerobios). Cualquier otra información sobre las propiedades del suelo podría resultar de utilidad para la interpretación de los resultados. Para la determinación de las características del suelo, podrán utilizarse los métodos recomendados en las referencias (19)(20)(21)(22)(23). La biomasa microbiana se determinará utilizando el método de respiración inducida por el sustrato (SIR) (25)(26) o un método alternativo (20).

1.8.3.2 *Recogida, manipulación y conservación de suelos*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del lugar donde se haya recogido el suelo de ensayo. En particular, localización precisa, cubierta vegetal, tratamientos con sustancias químicas, tratamientos con abonos orgánicos e inorgánicos, adición de materiales biológicos u otro tipo de contaminación. No deberán utilizarse para estudios sobre transformación suelos que hayan sido tratados con la sustancia de ensayo o un análogo estructural de la misma dentro de los cuatro años precedentes (10)(15).

La muestra deberá haber sido recogida recientemente (del horizonte A o capa superior de 20 cm) y su contenido en agua deberá facilitar su tamizado. Salvo en el caso de los suelos de arrozales paddy, deberá evitarse la toma de muestras durante o inmediatamente después de un largo período (> 30 días) de sequía, helada o inundación (14). Las muestras deberán transportarse de manera que el contenido en agua del suelo varíe lo menos posible y mantenerse en la oscuridad y ventiladas en la mayor medida posible. Suele estar indicado el uso de una bolsa de polietileno sin cerrar completamente.

Una vez tomada la muestra, deberá procesarse el suelo lo antes posible. Deberá retirarse la vegetación, la fauna edáfica de mayor tamaño y las piedras antes de hacer pasar el suelo por un tamiz de 2 mm que permita retirar los restos de vegetales y animales y pequeñas piedras. Se procurará evitar el secado y aplastamiento excesivos del suelo antes del tamizado (15).

Cuando resulte difícil tomar muestras en invierno (por hallarse el suelo helado o cubierto por una capa de nieve), podrá extraerse de un lote de suelo almacenado en el invernadero bajo cubierta vegetal (por ejemplo, hierba o mezcla de hierba y trébol). Pese a preferirse claramente los estudios con suelos recién recogidos del campo, si es preciso almacenar el suelo recogido y procesado antes de comenzar el estudio, las condiciones de conservación deberán ser las adecuadas y el plazo de almacenamiento limitado (4 ± 2 ºC durante un máximo de tres meses) para mantener la actividad microbiana ([2]). Se encontrarán instrucciones detalladas sobre la recogida, manipulación y conservación de suelos con vistas a su uso en experimentos de biotransformación en (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) La característica de retención de agua de un suelo puede medirse como capacidad de campo, como capacidad de retención de agua o como tensión de succión de agua (pF). Más explicaciones en el anexo 1. Deberá consignarse en el informe del ensayo si las características de retención de agua y la densidad aparente de los suelos se determinaron en muestras no perturbadas o en muestras perturbadas (procesadas).

([2]) Según los resultados de recientes investigaciones, los suelos de las zonas templadas pueden almacenarse también a - 20 ºC durante más de tres meses (28) (29) sin pérdida significativa de actividad microbiana.

▼B

Antes de utilizar en este ensayo el suelo procesado, deberá preincubarse este para hacer posible la germinación y eliminación de las semillas y restablecer el equilibrio del metabolismo microbiano tras el paso de las condiciones de muestreo o conservación a las de incubación. En general resulta adecuado un período de preincubación de entre 2 y 28 días en condiciones de temperatura y humedad próximas a las del ensayo real (15). La suma de los períodos de conservación y de preincubación no deberá exceder de tres meses.

1.9 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.9.1 **Condiciones de ensayo**

1.9.1.1 *Temperatura del ensayo*

Durante la totalidad del período de ensayo, deberán incubarse los suelos en la oscuridad a una temperatura constante que sea representativa de las condiciones climáticas en que tendrá lugar el uso o la liberación. Se recomienda una temperatura de 20 ± 2 ºC para todas las sustancias de ensayo que puedan llegar al suelo en climas templados. Deberá controlarse esta temperatura.

Si se trata de sustancias químicas aplicadas o liberadas en climas más fríos (por ejemplo, en países septentrionales, durante el otoño o el invierno), deberán incubarse muestras de suelo adicionales pero a una temperatura inferior (por ejemplo, 10± 2 ºC).

1.9.1.2 *Contenido de humedad*

Para los ensayos de transformación en condiciones aerobias, deberá ajustarse el contenido de humedad ([1]) del suelo a un pF situado entre 2,0 y 2,5 y mantenerse en ese valor (3) El contenido de humedad del suelo se expresa como cociente entre masa de agua y masa de suelo seco y debe ser controlado periódicamente (por ejemplo, a intervalos de 2 semanas) pesando los recipientes de incubación y compensando las pérdidas de agua mediante la adición de, preferiblemente, agua de grifo esterilizada por filtración. Habrá que procurar evitar o reducir al mínimo las pérdidas de sustancia de ensayo y/o productos de transformación por volatilización y/o fotodegradación (en su caso) durante la adición de humedad.

Para los ensayos de transformación en condiciones anaerobias y de arrozal, se satura de agua el suelo mediante inundación.

1.9.1.3 *Condiciones aerobias de incubación*

En los sistemas de flujo, se mantendrán las condiciones aerobias mediante baldeo intermitente o ventilación continua con aire húmedo. En los matraces biométricos, se mantendrá el intercambio de aire mediante difusión.

1.9.1.4 *Condiciones aerobias estériles*

Con el fin de obtener información sobre la importancia de la transformación abiótica de una sustancia de ensayo, las muestras de suelo podrán ser esterilizadas [sobre métodos de esterilización, véanse las referencias (16) y (29)], tratadas con una sustancia de ensayo estéril (por ejemplo, adición de solución a través de un filtro estéril) y aireadas con aire humidificado estéril según se describe en el punto 1.9.1.3. En el caso de los suelos de arrozal, será preciso esterilizar el suelo y el agua, y efectuar la incubación según se describe en el punto 1.9.1.6.

([1]) El suelo no deberá estar ni demasiado húmedo ni demasiado seco para mantener una aireación y nutrición adecuadas de la microflora edáfica. El contenido de humedad recomendado para un crecimiento microbiano óptimo se sitúa entre 40-60 % de capacidad de retención de agua (WHC) y entre 0,1-0,33 bar (6). Este último intervalo equivale a un pF comprendido entre 2,0 y 2,5. En el anexo 2 se dan los contenidos de humedad típicos de varios tipos de suelo.

▼B

1.9.1.5 *Condiciones anaerobias de incubación*

Para crear y mantener unas condiciones anaerobias, se procede a cubrir de agua (capa de 1-3 cm de agua) el suelo previamente tratado con la sustancia de ensayo e incubado en condiciones aerobias durante 30 días o una semivida o DT_{50} (el valor que sea más pequeño) y a inyectar un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) en el sistema de incubación ([1]). El sistema de ensayo deberá permitir la medición del pH, la concentración de oxígeno y el potencial redox e incluir dispositivos de fijación de productos volátiles. El sistema biométrico deberá estar cerrado, para evitar la entrada de aire por difusión.

1.9.1.6 *Condiciones de incubación de arrozal*

Para estudiar la transformación en suelos de arrozal, se inundará el suelo con una capa de agua de 1-5 cm y se aplica la sustancia de ensayo a la fase acuosa (9). Se recomienda que la profundidad del suelo sea de al menos 5 cm. El sistema se ventila con aire como en condiciones aerobias. Deberán controlarse y registrarse el pH, la concentración de oxígeno y el potencial redox de la capa acuosa. Será necesario un período de preincubación de al menos dos semanas antes de dar comienzo a los estudios de transformación (véase el punto 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Duración del ensayo*

Los estudios de tasa y vía no deberán exceder normalmente de 120 días ([2]) (3)(6)(8), porque transcurrido ese plazo es de esperar un decrecimiento de la actividad microbiana del suelo con el tiempo en un sistema artificial de laboratorio sin posibilidad de reconstitución natural. Cuando resulte necesario para caracterizar el declive de la sustancia de ensayo y la formación y declive de los principales productos de transformación, podrán prolongarse los estudios durante períodos más largos (por ejemplo, 6 o 12 meses) (8). El uso de un período de incubación más largo deberá quedar justificado en el informe del ensayo y acompañarse de medidas de biomasa durante y al final del período.

1.9.2 **Realización del ensayo**

Se colocan de 50 a 200 g de suelo (peso seco) en cada recipiente de incubación (véanse las figuras 1 y 2 del anexo 3) y se trata el suelo con la sustancia de ensayo mediante uno de los métodos descritos en el punto 1.8.2. Cuando se utilicen disolventes orgánicos para la aplicación de la sustancia de ensayo, deberán retirarse del suelo por evaporación. A continuación, se mezcla bien el suelo con una espátula y/o agitando el recipiente. Si el estudio se realiza en condiciones de arrozal, se mezclarán bien el suelo y el agua tras la aplicación de la sustancia de ensayo. Se analizarán pequeñas partes alícuotas (por ejemplo, 1 g) de los suelos tratados para comprobar la distribución uniforme de la sustancia de ensayo. Más adelante se presentan métodos alternativos.

([1]) Las condiciones aerobias son dominantes en los suelos superficiales e incluso en los situados debajo de la superficie, según demuestra un proyecto de investigación patrocinado por la UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Las condiciones anaerobias se presentan tan solo ocasionalmente con motivo de la inundación del suelo tras lluvias intensas o cuando se establecen las condiciones de arrozal.

([2]) Los estudios aerobios podrían terminar mucho antes de estos 120 días siempre que se haya establecido manifiestamente la vía de transformación última y la mineralización última. Es posible asimismo la terminación del ensayo a los 120 días, o cuando se haya transformado el 90 % de la sustancia de ensayo, pero solo si se ha formado al menos un 5 % de CO_2.

▼B

La tasa de tratamiento debe corresponder a la tasa de aplicación más elevada de un producto fitosanitario recomendada en las instrucciones de empleo y a incorporación uniforme a una profundidad apropiada en el campo [por ejemplo, capa superior ([1]) de 10 cm de suelo]. Por ejemplo, para productos químicos aplicados sobre el follaje o el suelo sin incorporación, la profundidad apropiada para calcular la cantidad de producto químico que debe añadirse a cada recipiente es de 2,5 cm. Para productos químicos incorporados al suelo, la profundidad apropiada es la profundidad de incorporación especificada en las instrucciones de empleo. Para productos químicos ordinarios, deberá calcularse la tasa de aplicación sobre la base de la vía de penetración más importante; por ejemplo, cuando la vía principal de penetración en el suelo sean los lodos de depuración, deberá dosificarse el producto químico en el lodo a una concentración que corresponda a la concentración prevista en el lodo y deberá añadirse al suelo una cantidad de lodo que corresponda a su carga normal en los suelos agrícolas. Si esta concentración no es suficientemente elevada para permitir la identificación de los principales productos de transformación, podrá proceder la incubación de muestras de suelo independientes que contengan tasas superiores, pero deben evitarse las tasas excesivas que influyan en las funciones microbianas del suelo (véanse los puntos 1.5 y 1.8.2).

Alternativamente, se podrá tratar un lote de suelo mayor (de 1 a 2 kg) con la sustancia de ensayo, mezclándolo bien en una máquina mezcladora adecuada y transfiriéndolo luego en porciones pequeñas de 50 a 200 g a los recipientes de incubación (por ejemplo utilizando separadores de muestras). Se analizarán pequeñas partes alícuotas (por ejemplo, 1 g) del lote de suelo tratado para comprobar la distribución uniforme de la sustancia de ensayo. Resulta preferible este procedimiento porque hace posible una distribución más uniforme de la sustancia de ensayo en el suelo.

Por otra parte, se incuban muestras de suelo no tratadas en las mismas condiciones (aerobias) de las muestras tratadas con la sustancia de ensayo. Estas muestras se utilizan para medición de biomasa durante los estudios y al finalizar estos.

Cuando se aplica al suelo la sustancia de ensayo disuelta en uno o más disolventes orgánicos, se incuban muestras de suelo tratadas con la misma cantidad de disolvente(s) en las mismas condiciones (aerobias) que las muestras tratadas con la sustancia de ensayo. Estas muestras se utilizan para medir la biomasa al comienzo, durante y al final de los estudios, con el fin de comprobar los efectos del disolvente o los disolventes en la biomasa microbiana.

Los recipientes con el suelo tratado serán conectados al sistema de flujo descrito en la figura 1 o cerrados con la columna de absorción mostrada en la figura 2 (véase el anexo 3).

([1]) La concentración inicial en una superficie se calcula utilizando la ecuación siguiente:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d\left[kg_{soil}/m^{3}\right]}$$

C_{soil} = concentración inicial en el suelo [$mg.kg^{-1}$]

A = tasa de aplicación [$kg.ha^{-1}$]; l = espesor de la capa de suelo en el campo [m]; d = densidad aparente en seco del suelo [$kg\text{-}m^{-3}$].

A título indicativo, una tasa de aplicación de 1 $kg.ha^{-1}$ da por resultado una concentración en el suelo de aproximadamente 1 $mg.kg^{-1}$ en una capa de 10 cm (supuesta una densidad aparente de 1 g . cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Muestreo y medidas**

Se retirarán los recipientes de incubación duplicados a intervalos de tiempo apropiados, extrayéndose muestras de suelo con disolventes adecuados de distinta polaridad y analizándose para medir la sustancia de ensayo y/o los productos de transformación. Un estudio bien diseñado deberá incluir recipientes suficientes, de manera que puedan sacrificarse dos en cada toma de muestras. De la misma manera, se retirarán soluciones de absorción o materiales sólidos de absorción a distintos intervalos temporales (de 7 días durante el primer mes y de 17 días posteriormente) durante y al final de la incubación de cada muestra de suelo y se analizan para medir productos volátiles. Además de la muestra de suelo tomada directamente tras la aplicación (muestra del día cero), deberán incluirse al menos 5 puntos de muestreo adicionales. Se escogerán los intervalos de tiempo de manera que se pueda determinar el patrón de declive de la sustancia de ensayo y los patrones de formación y declive de los productos de transformación (por ejemplo, 0, 1, 3, 7 días; 2,3 semanas; 1, 2, 3 meses, etc.).

Cuando se use una sustancia de ensayo marcada con ^{14}C, se cuantificará la radiactividad no extraíble mediante combustión y se calculará un balance de materia para cada intervalo de muestreo.

En caso de incubación anaerobia o de arrozal, se podrán analizar conjuntamente las fases de suelo y agua para medir la sustancia de ensayo y los productos de transformación, o separarlas por filtración o centrifugado antes de la extracción y el análisis.

1.9.4 **Ensayos facultativos**

Podría resultar de utilidad la realización de estudios aerobios no estériles para otros valores de temperatura y humedad del suelo para estimar la influencia de la temperatura y la humedad del suelo sobre la tasa de transformación de una sustancia de ensayo y/o de sus productos de transformación en el suelo.

Puede intentarse otra caracterización de la radiactividad no extraíble utilizando, por ejemplo, extracción mediante fluido supercrítico.

2 RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Las cantidades de sustancia de ensayo, productos de transformación, sustancias volátiles (solo en porcentaje) y no extraíbles se expresarán en porcentaje de la concentración inicial aplicada y, cuando proceda, en $mg.kg^{-1}$ de suelo (sobre la base del peso del suelo en seco) para cada intervalo de muestreo. El balance de materia se expresará en porcentaje de la concentración inicial aplicada para cada intervalo de muestreo. La representación gráfica de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo permitirá estimar la semivida de su transformación o DT_{50}. Deberán identificarse los principales productos de transformación y se representarán gráficamente sus concentraciones en función del tiempo para mostrar sus tasas de formación y declive. Se considerará producto de transformación principal cualquier producto que represente ≥ 10 % de la dosis aplicada en cualquier momento del estudio.

Los productos volátiles fijados dan una indicación de la volatilidad potencial de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación a partir del suelo.

▼B

Se obtendrán determinaciones más exactas de las semividas o valores DT_{50} y, si procede, valores DT_{75} y DT_{90}, mediante cálculos con los modelos cinéticos apropiados. Se consignarán los valores de semivida y DT_{50} junto con la descripción del modelo utilizado, el orden de la cinética y el coeficiente de determinación (r^2). Se prefiere la cinética de primer orden salvo que $r^2 < 0{,}7$. Si procede, se aplicarán los cálculos asimismo a los principales productos de transformación. En las referencias (31) a (35) se describen ejemplos de modelos adecuados.

Si se trata de estudios de tasas efectuados a varias temperaturas, las tasas de transformación deberán describirse como función de la temperatura dentro del intervalo de temperaturas experimental utilizando la relación de Arrhenius de la forma:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ o } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

donde ln A y B son constantes de regresión que corresponden a la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente, de una recta de mejor ajuste generada por regresión lineal de ln k frente a 1/T, k es la constante de tasa a temperatura T y T es la temperatura en Kelvin. Deberá prestarse atención al intervalo limitado de temperaturas en el que será válida la relación de Arrhenius en el caso de que la transformación esté gobernada por la acción microbiana.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Aunque los estudios se realizan en un sistema artificial de laboratorio, los resultados permitirán estimar la tasa de transformación de la sustancia de ensayo e igualmente la tasa de formación y declive de los productos de transformación en condiciones de campo (36)(37).

El estudio de la vía de transformación de una sustancia de ensayo aporta información sobre la transformación estructural de la sustancia aplicada en el suelo por reacciones químicas y microbianas.

3 INFORME

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la(s) posición(es) del marcador(es) cuando se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 1.5),

— pureza (impurezas) de la sustancia de ensayo,

— pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad específica (si procede).

Sustancias de referencia:

— nombre químico y estructura de las sustancias de referencia utilizadas para caracterizar y/o identificar los productos de transformación.

Suelos de ensayo:

— detalles del lugar donde se recogieron,

— fecha y procedimiento de muestreo,

▼B

— propiedades de los suelos, tales como pH, contenido de carbono orgánico, textura (% arena, % limo, % arcilla), capacidad de intercambio de cationes, densidad aparente, característica de retención de agua y biomasa microbiana,

— duración del almacenamiento y condiciones de conservación (si se ha almacenado).

Condiciones de ensayo:

— fechas de realización de los estudios,

— cantidad de la sustancia de ensayo aplicada,

— disolventes utilizados y método de aplicación de la sustancia de ensayo,

— peso del suelo tratado inicialmente y muestreado a cada intervalo para su análisis,

— descripción del sistema de incubación utilizado,

— tasas de flujo de aire (solo para sistemas de flujo),

— temperatura de la configuración experimental,

— contenido de humedad del suelo durante la incubación,

— biomasa microbiana al comienzo, durante y al final de los estudios aerobios,

— pH, concentración de oxígeno y potencial redox al comienzo, durante y al final de los estudios anaerobios y de arrozal,

— método(s) de extracción,

— métodos de cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de los principales productos de transformación en el suelo y los materiales de absorción,

— número de duplicados y número de controles.

Resultados:

— resultado de la determinación de la actividad microbiana,

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— tasas de recuperación (en el punto 1.7.1 se dan los valores porcentuales para un estudio válido),

— cuadros de resultados expresados como porcentaje de la dosis inicial aplicada y, si procede, en $mg.kg^{-1}$ de suelo (sobre la base del peso en seco),

— balance de materia durante y al final de los estudios,

— caracterización de la radiactividad no extraíble (ligada) o los residuos en el suelo,

— cuantificación del CO_2 y otros compuestos volátiles liberados,

— representación gráfica de concentración en el suelo en función del tiempo de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación,

— semivida o DT_{50}, DT_{75} y DT_{90} de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación, incluyendo límites de confianza,

▼B

— estimación de la tasa de degradación abiótica en condiciones estériles,

— valoración de la cinética de transformación de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación,

— vías de transformación propuestas, si procede,

— evaluación e interpretación de los resultados,

— datos en bruto (muestras de cromatogramas, muestras de cálculos de tasas de transformación y medios utilizados para identificar los productos de transformación).

4 **REFERENCIAS**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Unión Europea (UE) (1995). Directiva 95/36/CE de la Comisión, de 14 de julio de 1995, por la que se modificà la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos Fitosanitarios. Anexo II, parte A y anexo III, parte A: Destino y comportamiento en el medio ambiente.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56,945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Anexo V de la Dir. 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VU, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Anexo 1

TENSIÓN DE AGUA, CAPACIDAD DE CAMPO (FC) Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (WHC) ([1])

Altura de la columna de agua [cm]	PF ([a])	bar ([b])	Observaciones
10'	7	10^4	Suelo seco
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Punto de marchitamiento
10^4	4	10	
10^3	3	1	
6.10^2	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	Gama de Capacidad de campo ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (aproximación)
1	0	0,001	Suelo saturado de agua

([a]) pF = log de Ja altura en cm de la columna de agua.
([b]) 1 bar= 10^5 Pa.
([c]) Corresponde a un contenido de agua aproximado de 10 % en arena, 35 % en suelo franco y 45 % en arcilla.
([d]) La capacidad de campo no es constante, sino que varía con el tipo de suelo entre pF 1,5 y 2,5.

La *tensión de agua* se mide en cm de columna de agua o en bar. Dada la amplia gama de valores posibles, la tensión de succión se expresa sencillamente como el valor pF equivalente al logaritmo de la altura en cm de la columna de agua.

La *capacidad de campo* se define como la cantidad de agua que puede almacenar un suelo natural contra la gravedad 2 días después de un largo período de lluvia o tras una irrigación suficiente. Se determina sobre el terreno en un suelo no perturbado. Por ello, la medida no es aplicable a muestras de suelo de laboratorio perturbadas. Los valores de FC determinados en suelos perturbados pueden mostrar grandes varianzas sistemáticas.

La *capacidad de retención de agua* (WHC) se determina en el laboratorio con suelo perturbado y no perturbado mediante saturación con agua de una columna de suelo por transporte capilar. Resulta especialmente útil para suelos perturbados y puede ser hasta un 30 % superior a la capacidad de campo (1). Además, experimentalmente es más fácil determinar la WHC que valores de FC fiables.

Notas

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Anexo 2

CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO (g de agua por 100 g de suelo seco) DE VARIOS TIPOS DE SUELO DE DIVERSOS PAÍSES

Tipo de suelo	País	Contenido de humedad del suelo a		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Arena	Alemania	28,7	8,8	3,9
Suelo arenoso franco	Alemania	50,4	17,9	12,1
Suelo arenoso franco	Suiza	44,0	35,3	9,2
Suelo franco limoso	Suiza	72,8	56,6	28,4
Suelo franco arcilloso	Brasil	69,7	38,4	27,3
Suelo franco arcilloso	Japón	74,4	57,8	31,4
Suelo franco arenoso	Japón	82,4	59,2	36,0
Suelo franco limoso	EE.UU.	47,2	33,2	18,8
Suelo franco arenoso	EE.UU.	40,4	25,2	13,3

(1) Capacidad de retención de agua.

▼B

Anexo 3

Figura 1

Ejemplo de aparato de flujo para estudiar la transformación de las sustancias químicas en el suelo ([1]) ([2])

1 = Válvula de aguja

2 = Lavador de gas que contiene agua

3 = Ultramembrana (solo en condiciones estériles), tamaño de poro de 0,2 µm

4 = Frasco de metabolismo del suelo (encharcado solo para condiciones anaerobias o de arrozal)

5 = Fijador de glicol etileno para compuestos orgánicos volátiles

6 = Fijador de ácido sulfúrico para compuestos alcalinos volátiles

7, 8 = Fijador de hidróxido de sodio para CO_2 y compuestos ácidos volátiles

9 = Caudalímetro

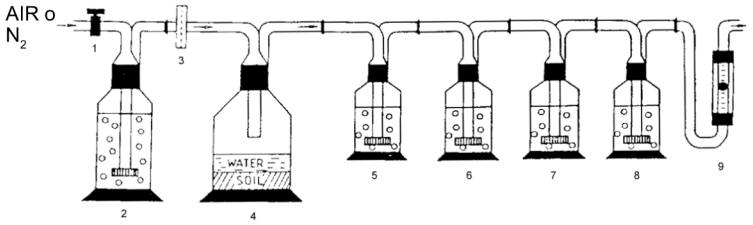
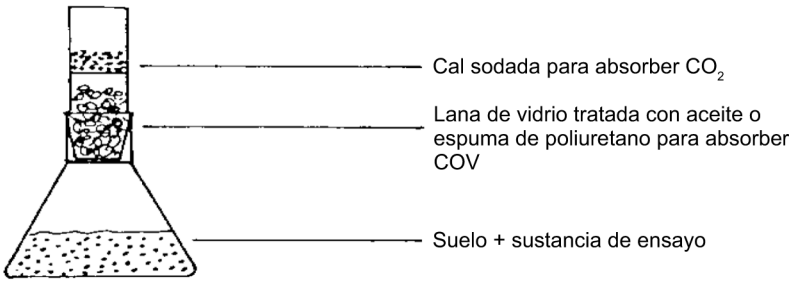


Figura 2

Ejemplo de matraz biométrico para el estudio de la transformación de las sustancias químicas en el suelo ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soi] (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VU, 141-146.

▼B

C.24. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN SISTEMAS DE SEDIMENTOS ACUÁTICOS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 308 (2002).

1.1 INTRODUCCIÓN

Los productos químicos pueden llegar a las aguas superficiales a nivel profundo o poco profundo por vías como la aplicación directa, los aerosoles erráticos, la escorrentía, la eliminación de residuos, los efluentes domésticos o agrícolas y la deposición atmosférica. Este método de ensayo consiste en un método de laboratorio para evaluar la transformación aerobia y anaerobia de las sustancias químicas orgánicas en los sistemas de sedimentos acuáticos. El método se basa en directrices ya existentes (1)(2)(3)(4)(5)(6). En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (7) se alcanzó un acuerdo, en particular, sobre el número y tipos de sedimentos que deben utilizarse en este ensayo. Dicho seminario formuló asimismo recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de sedimentos, basadas en la Directriz ISO correspondiente (8). Estos estudios son necesarios para las sustancias químicas que se apliquen directamente al agua o que tengan probabilidades de llegar al medio ambiente acuático por las vías mencionadas anteriormente.

Las condiciones en los sistemas de sedimentos acuáticos naturales son a menudo aerobias en la fase acuosa superior. La capa superficial del sedimento puede ser o bien aerobia o bien anaerobia, mientras que el sedimento más profundo normalmente es anaerobio. Para abarcar todas estas posibilidades, en el presente documento se describen tanto ensayos aerobios como anaerobios. El ensayo aerobio simula una columna de agua aerobia sobre una capa de sedimento aerobio a la que subyace una gradiente anaerobio. El ensayo anaerobio simula un sistema de sedimento acuático completamente anaerobio. Si las circunstancias indican que es necesario desviarse significativamente de estas recomendaciones, por ejemplo utilizando núcleos de sedimentos intactos o sedimentos que haya estado expuestos a las sustancia de ensayo, se dispone de otros métodos con este fin (9).

1.2 DEFINICIONES

En cualquier caso deben utilizarse unidades internacionales (Standard International (SI) units).

Sustancia de ensayo: cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

Productos de transformación: todas las sustancias resultantes de las reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia de ensayo, incluido el CO_2 y los residuos ligados.

Residuos ligados: compuestos del suelo, la planta o el animal que persisten en la matriz en forma de sustancia original o de sus productos de transformación/metabolitos tras la extracción. El método de extracción no debe modificar sustancialmente ni los propios compuestos ni la estructura de la matriz. La naturaleza del vínculo puede aclararse parcialmente mediante métodos de extracción que alteren la matriz y técnicas analíticas sofisticadas. Así por ejemplo, hasta la fecha se han identificado de esta manera enlaces covalentes, iónicos y de sorción, así como atrapamientos. En general, la formación de residuos ligados reduce de manera significativa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (10) [modificado de TUPAC 1984 (11)].

▼B

Transformación aerobia: (oxidación) reacciones que se producen en presencia de oxígeno molecular (12).

Transformación anaerobia: (reducción) reacciones que se producen en ausencia de oxígeno molecular (12).

Aguas naturales: aguas superficiales obtenidas de estanques, ríos, arroyos, etc.

Sedimento: mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado. El sedimento es depositado por las aguas naturales y forma una interfaz con el agua.

Mineralización: degradación completa de un compuesto orgánico a CO_2 y H_2O en condiciones aerobias y a CH_4, CO_2 y H_2O en condiciones anaerobias. En el contexto del presente método, cuando se utiliza un compuesto radiomarcado, mineralización significa la amplia degradación de una molécula durante la cual se oxida un átomo de carbono marcado o se reduce cuantitativamente con liberación de la cantidad apropiada de $^{14}CO_2$ o $^{14}CH_4$, respectivamente.

Semivida: $t_{0,5}$, es el tiempo que tarda la transformación del 50 % de una sustancia de ensayo cuando puede describirse dicha transformación mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración inicial.

DT_{50} (tiempo de desaparición SO): es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 50 %.

DT_{75} (tiempo de desaparición 75): es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 75 %.

DT_{90} (tiempo de desaparición 90): es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 90 %.

1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Deben utilizarse sustancias de referencia para la cuantificación e identificación de los productos de transformación por métodos espectroscópicos o cromatográficos.

1.4 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la tasa de transformación podrá utilizarse una sustancia de ensayo no marcada o marcada con un isótopo, aunque se prefiere el material marcado. Para estudiar la vía de transformación y establecer un balance de materia se requiere material marcado. Se recomienda el marcado con ^{14}C, pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H o ^{32}P. El marcador deberá ubicarse, en la medida de lo posible, en la parte o las partes más estables de la molécula ([1]). La pureza química y/o radioquímica de la sustancia de ensayo debe ser de al menos el 95 %.

Antes de llevar a cabo el ensayo, debe disponerse de la información siguiente sobre la sustancia de ensayo:

a) solubilidad en agua (Método A.6);

b) solubilidad en disolventes orgánicos;

c) presión de vapor (Método A.4) y constante de la ley de Henry;

([1]) Por ejemplo, si la sustancia de ensayo contiene un anillo, es preciso marcar ese anillo: si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de transformación.

▼B

d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (Método A.8);

e) coeficiente de adsorción (K_d, Kf o K_{oc}, en su caso) (Método C. 18);

f) hidrólisis (Método C.7);

g) constante de disociación (pK_a) [Directriz OECD 112] (13);

h) estructura química de la sustancia de ensayo y posición de la marca o marcas isotópicas, en su caso.

Nota: Debe indicarse la temperatura a la que se hicieron estas mediciones.

Además, puede incluirse otra información de utilidad como datos sobre la toxicidad de la sustancia de ensayo para los microorganismos, sobre la biodegrabilidad inherente o inmediata, y sobre la transformación aerobia y anaerobia en el suelo.

Debe contarse con métodos analíticos (incluidos métodos de extracción y depuración) para la cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación en el agua y los sedimentos (véase el punto 1.7.2).

1.5 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El método descrito en este ensayo emplea un sistema de sedimento acuático aerobio y anaerobio (véase el anexo 1) que permite:

i) la medición de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo en un sistema de sedimento-agua,

ii) la medición de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo en el sedimento,

iii) la medición de la tasa de mineralización de la sustancia de ensayo y/o sus productos de transformación (cuando se utiliza una sustancia de ensayo marcada con ^{14}C),

iv) la identificación y cuantificación de los productos de transformación en las fases acuática y de sedimentaria incluido el balance de materia (cuando se utilice una sustancia de ensayo marcada),

v) la medición de la distribución de la sustancia de ensayo y sus productos de transformación entre las dos fases durante un período de incubación en la oscuridad (para evitar, por ejemplo, floraciones de algas) a temperatura constante; las semividas y los valores DT50, DT75 y DT_{90} se determinarán cuando los datos lo permitan, pero no deben extrapolarse mucho más allá del período experimental (véase el punto 1.2).

Se requieren al menos dos sedimentos y sus aguas asociadas para cada uno de los estudios aerobio y anaerobio (7). Sin embargo, puede haber casos en los que se usen más de dos sedimentos acuáticos, por ejemplo, para una sustancia química que pueda estar presente en entornos de aguas dulces y/o marinas.

▼B

1.6 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método es aplicable en general a todas las sustancias químicas (no marcadas o marcadas) para las que se disponga de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles, no volátiles, solubles en agua o poco solubles en agua. El ensayo no deberá aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del agua (por ejemplo, fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en el agua y/o el sedimento en las condiciones experimentales del presente ensayo.

Este método se ha aplicado hasta ahora para estudiar la transformación de sustancias químicas en aguas dulces y sedimentos, pero, en principio, se puede aplicar también a sistemas marinos/de estuarios. No es adecuado para simular las condiciones de aguas corrientes (por ejemplo, ríos) o el mar abierto.

1.7 CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1 **Recuperación**

La extracción y el análisis de muestras de agua y sedimento, cuando menos duplicadas, inmediatamente después de la adición de la sustancia de ensayo dan una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia de ensayo. Los valores de recuperación para fases posteriores del experimento los dan los balances de materia respectivos (cuando se utiliza material marcado). Dichos valores deben situarse entre el 90 % y el 110 % para sustancias químicas marcadas (6) y entre el 70 % y el 110 % para sustancias químicas no marcadas.

1.7.2 **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método analítico (excluida la eficiencia de extracción inicial) para cuantificar la sustancia de ensayo y los productos de transformación puede comprobarse realizando un análisis por duplicado del mismo extracto de las muestras de agua o sedimento que fueron incubadas durante tiempo suficiente para que se formaran productos de transformación.

El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia de ensayo y de los productos de transformación debe alcanzar, como mínimo, el menor de los siguientes valores: 0,01 $mg.kg^{-1}$ de agua o sedimento (como sustancia de ensayo) o un 1 % de la cantidad inicial aplicada a un sistema de ensayo. También debe especificarse el límite de cuantificación (LOQ).

1.7.3 **Exactitud de los datos de transformación**

El análisis de regresión de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo facilita la información apropiada sobre la fiabilidad de la curva de transformación y permite calcular los límites de confianza de las semividas (en el caso de la cinética de pseudo primer orden) o los valores DT_{50} y, si procede, DT_{75} y DT_{90}.

1.8 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.8.1 **Sistema de ensayo y equipo**

El estudio debe hacerse en recipientes de vidrio (por ejemplo, frascos, tubos de centrifugación), a menos que se disponga de información preliminar (como el coeficiente de reparto n-octanol/agua, datos sobre adsorción, etc.) que indiquen que la sustancia de ensayo puede adherirse al vidrio, en este caso tendrá que estudiarse la posibilidad de emplear un material alternativo (como Teflon). Cuando se sepa que la sustancia de ensayo se adhiere al vidrio, podrá paliarse el problema recurriendo a uno o varios de los métodos siguientes:

▼B

— determinar la masa de la sustancia de ensayo y los productos de transformación que adsorbe el vidrio,

— hacer un lavado con disolvente de todos los recipientes de vidrio al final del ensayo,

— utilizar productos formulados (véase también el punto 1.9.2),

— utilizar una cantidad mayor de co-disolvente para añadir la sustancia de ensayo al sistema; si se emplea un co-disolvente debe tratarse de uno que no solvate la sustancia de ensayo.

En los anexos 2 y 3, respectivamente, se muestran ejemplos de aparatos de ensayo habituales, por ejemplo, sistemas de flujo de gas y biométricos (14). En la referencia 15 se describen otros sistemas útiles de incubación. El diseño del aparato experimental debe permitir el intercambio de aire o nitrógeno y la fijación de los productos volátiles. Las dimensiones del aparato deben ser tales que se cumplan los requisitos del ensayo (véase el punto 1.9.1). Podrá ventilarse o bien mediante un burbujeo suave o bien haciendo pasar aire o nitrógeno sobre la superficie del agua. En este último caso puede ser aconsejable agitar suavemente el agua desde arriba para una mejor distribución del oxígeno o el nitrógeno en esta. No debe usarse aire sin CO_2 ya que puede aumentar el pH del agua. En cualquiera de los dos casos, no es conveniente remover el sedimento, cosa que debe evitarse todo lo posible. Las sustancias químicas ligeramente volátiles deben ensayarse en sistema biométrico con una agitación suave de la superficie del agua. También pueden utilizarse recipiente cerrados con un espacio libre o bien de aire atmosférico o bien de nitrógeno y frascos internos para la fijación de productos volátiles (16). En el ensayo aerobio se requiere un intercambio regular del gas del espacio libre a fin de compensar el consumo de oxígeno de la biomasa.

Entre los fijadores adecuados para recoger productos de transformación volátiles cabe citar, de manera no exhaustiva, las soluciones $1 mol.dm^{-3}$ de hidróxido de potasio o hidróxido de sodio para el dióxido de carbono ([1]) y el etileno glicol, la etanolamina o la parafina al 2 % en xileno para los compuestos orgánicos. Los compuestos volátiles formados en condiciones anaerobias, como el metano, pueden recogerse, por ejemplo, mediante tamices moleculares. Estos compuestos volátiles pueden convertirse, por ejemplo, en CO_2 por combustión haciendo pasar el gas por un tubo de cuarzo lleno de CuO a una temperatura de 900 ^{o}C y captando el CO_2 formado en un absorbedor con una base (17).

Se requiere un equipo de laboratorio para el análisis químico de la sustancia de ensayo y los productos de transformación (por ejemplo, cromatografía líquida de gases (GLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), espectroscopia de masas (MS), cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS), espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN), etc.), incluidos sistemas de detección para sustancias químicas radiomarcadas o no radiomarcadas, según corresponda. Cuando se utilice material radiomarcado se necesitará también un contador de centelleo de líquidos y una cámara de combustión oxidante (para la combustión de muestras de sedimento antes del análisis de radiactividad).

Además se necesitará, según corresponda, otro equipo de laboratorio estándar para análisis fisicoquímicos y biológicos (véase el cuadro 1, punto 1.8.2.2), así como recipientes de vidrio, sustancias químicas y reactivos.

([1]) Como estas soluciones de absorción alcalinas absorben también el dióxido de carbono del aire de la ventilación y el formado por la respiración en los experimentos aerobios, tienen que cambiarse a intervalos regulares para evitar su saturación y, así, la pérdida de su capacidad de absorción.

▼B

1.8.2 **Selección y número de sedimentos acuáticos**

Los lugares donde se tomen las muestras deberán seleccionarse con arreglo a la finalidad del ensayo en cualquier situación dada. Al seleccionar los lugares donde se tomen las muestras, se tendrá en cuenta su historia en cuanto a posibles aportaciones de origen agrícola, industrial o doméstico a la cuenca o los ríos o arroyos aguas arriba. No deben usarse sedimentos si han sido contaminados con la sustancia de ensayo o sus análogos estructurales durante los 4 años anteriores.

1.8.2.1 *Selección de sedimentos*

Para los estudios aerobios se utilizarán normalmente dos sedimentos (7). Los dos sedimentos seleccionados tienen que ser distintos en cuanto a contenido de carbono orgánico y textura. Un sedimento ha de tener un elevado contenido de carbono orgánico (2,5-7,5 %) y una textura fina, y el otro, un bajo contenido de carbono orgánico (0,5-2,5 %) y una textura gruesa. La diferencia en cuanto al contenido de carbono orgánico debe ser normalmente, al menos, del 2 %. Se entiende por «textura fina» un contenido de [arcilla+limo] ([1]) >50 % y por «textura gruesa», un contenido de [arcilla+limo] de <50 %. La diferencia en cuanto al contenido de [arcilla+limo] debe ser normalmente, al menos, del 20 %. En los casos en que una sustancia química pueda llegar también a las aguas marinas, al menos uno de los sistemas de sedimentos acuáticos deberá ser de origen marino.

Para el estudio estrictamente anaerobio, deben tomarse muestras de dos sedimentos (incluidas sus aguas asociadas) de las zonas anaerobias de las masas de agua superficiales (7). Tanto el sedimento como las fases acuáticas tienen que manejarse y transportarse cuidadosamente en condiciones de exclusión de oxígeno.

Puede haber otros parámetros que sean importantes para la selección de los sedimentos y que deban considerarse caso por caso. Por ejemplo, el pH de los sedimentos sería importante para ensayar sustancias químicas cuando su transformación y/o adsorción pueda depender de este. La dependencia de la adsorción con respecto al pH podría venir dada por la pK_a de la sustancia de ensayo.

1.8.2.2 *Caracterización de las muestras sedimento-agua*

En el cuadro a continuación se resumen los parámetros clave que deben medirse e indicarse (con referencia al método utilizado) tanto para el agua como para el sedimento, y la fase del ensayo en la que deben determinarse. En la bilbiografía, referencias (18)(19)(20) y (21), se dan, a título informativo, los métodos de determinación de estos parámetros.

Además, puede ser necesario medir e indicar caso por caso otros parámetros (por ejemplo, para las aguas dulces: partículas, alcalinidad, dureza, conductividad y NO_3/PO_4 (proporción y valores de cada compuesto); para los sedimentos: capacidad de intercambio de cationes, capacidad de retención de agua, carbonates, fósforo y nitrógeno totales; y para los sistemas marinos: salinidad. El análisis de los sedimentos y el agua para detectar nitratos, sulfatos, hierro biodisponible y posiblemente otros aceptadores de electrones puede ser útil también al valorar las condiciones redox, especialmente en relación con la transformación anaerobia.

([1]) [Arcilla+limo] es la fracción mineral del sedimento con un tamaño de partícula < 50 μm.

▼B

Medición de parámetros para la caracterización de las muestras agua-sedimentos (7)(22)(23)

Parametro	Fase del procedimiento de ensayo					
	muestreo in situ	manejo posterior	inicio de la aclimatación	al inicio del ensayo	durante el ensayo	al final del ensayo
Agua						
Origen/fuente	x					
Temperatura	x					
pH*	x		x	x	x	x
COT			x	x		x
Concentración de O_2*	x		x	x	x	x
Potencial redox*			x	x	x	x
Sedimento						
Origen/fuente	x					
Profundidad de la capa	x					
pH (*)		x	x	x	x	x
Distribución del tamaño de las partículas		x				
COT		x	x	x		x
Biomasa microbiana (**)		x		x		x
Potencial redox (*)	Observación (color/olor)		x	x	x	x

(*) Los resultados de investigaciones recientes han mostrado que las mediciones de las concentraciones de oxígeno en el agua y los potenciales redox no tienen un valor mecáno ni predictivo on lo que se refiere al crecimiento y desarrollo de poblaciones microbianas en aguas superficiales (24)(25). La determinacíon de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO en la toma de muestras, el inicio y el final del ensayo) y de las concentraciones de *los micro/macronutrientes* Ca, Mg y Mn (al inicio y al final del ensayo) en el agua, y la medición de N y el P totales en los sedimentos (en la toma de muestras y al final del ensayo) pueden ser instrumentos mejores para interpretar y evaluar las tasas y las vías de biotransformación aerobia.

(**) Método de la tasa de respiración microbiana (26), método de la fumigación (27) o mediciones de recuento en placas (por ejemplo, bacterias, actinomicetos, hongos y colonias totales) para estudios anaerobios; tasa de metanogénesis para estudios anaerobios

1.8.3 **Recogida, manejo y almacenamiento**

1.8.3.1 *Recogida*

Para la toma de muestras de sedimentos, deberá utilizarse el proyecto de Directriz ISO sobre la toma de muestras de sedimentos de fondo (8). Las muestras de sedimento se tomarán de toda la capa superior de 5 a 10 cm del sedimento. El agua asociada debe recogerse del mismo lugar y al mismo tiempo que el sedimento. Para el estudio anaerobio, las muestras de sedimento y agua asociada deben tomarse en condiciones de exclusión de oxígeno (28) (véase el punto 1.8.2.1). En la bibliografía se describen algunos aparatos de toma de muestras (8) (23).

▼B

1.8.3.2 *Manejo*

El sedimento se separa del agua por filtración y se tamiza por va húmeda a través de una criba de 2 mm utilizando el agua del lugar de recogida sobrante que luego se tira. A continuación, las cantidades conocidas de sedimentos y agua se mezclan en la proporción deseada (véase el punto 1.9.1) en los recipientes de incubación y se preparan para el período de aclimatación (véase el punto 1.8.4). Para el estudio anaerobio, todas las etapas del manejo tiene que llevarse a cabo en condiciones de exclusión de oxígeno (29) (30) (31) (32) y (33).

1.8.3.3 *Almacenamiento*

Se recomienda encarecidamente utilizar sedimentos y agua recién recogidos, pero, si es necesario el almacenamiento, el sedimento y el agua tiene que tamizarse como se ha descrito anteriormente y almacenarse juntos, empapados en agua (en una capa de agua de 6-10 cm), en la oscuridad y a 4 ± 2 ºC[4] durante un máximo de 4 semanas (7) (8) (23). Las muestras utilizadas par estudios aerobios tienen que almacenarse de manera que el aire pueda acceder libremente (por ejemplo, en recipientes abiertos), mientras que las de estudios anaerobios tiene que estar en condiciones de exclusión de oxígeno. No debe haber congelación del sedimento y el agua ni secado del sedimento durante el transporte y el almacenamiento.

1.8.4 **Preparación de las muestras de sedimento/agua para el ensayo**

Tiene que haber un período de aclimatación antes de añadir la sustancia de ensayo, teniendo en cuenta que cada muestra de sedimento/agua ha de colocarse en el recipiente de incubación que se vaya a usar en el ensayo principal, y que la aclimatación ha de llevarse a cabo exactamente en las mismas condiciones que la incubación para el ensayo (véase el punto 1.9.1). El período de aclimatación es el tiempo necesario para alcanzar una estabilidad razonable del sistema, expresada mediante el pH, la concentración de oxígeno en el agua, el potencial redox del sedimento y el agua, y la separación macroscópica de las fases. El período de aclimatación debe durar normalmente entre una y dos semanas y no debe superar las cuatro semanas. Se indicarán los resultados de las determinaciones efectuadas durante este período.

1.9 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.9.1 **Condiciones del ensayo**

El ensayo deberá hacerse en el aparato de incubación (véase el punto 1.8.1) con una proporción agua/sedimento en volumen entre 3:1 y 4:1, y urta capa de sedimento de 2,5 cm (± 0,5 cm). Se recomienda una cantidad mínima de sedimento de 50 g (en peso seco) por recipiente de incubación.

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura constante dentro de un intervalo de 10 a 30 ºC. Se considera apropiada una temperatura de 20 ± 2 ºC. En su caso, podría considerarse otra temperatura más baja (por ejemplo, 10 ºC) en determinados casos concretos, según la información que desee obtenerse del ensayo. Deberá controlarse e indicarse la temperatura de incubación.

▼B

1.9.2 **Tratamiento y aplicación de la sustancia de ensayo**

Se utilizará una única concentración para el ensayo. Para productos fitosanitarios aplicados directamente a las masas de agua, la dosificación máxima indicada en la etiqueta debe tomarse como la tasa de aplicación máxima calculada basándose en la superficie del agua en el recipiente de ensayo. En todos los demás casos, la concentración que ha de emplearse tiene que basarse en las previsiones de emisiones medioambientales. Se procurará aplicar una concentración adecuada de la sustancia de ensayo a fin de caracterizar la vía de transformación y la formación y la desaparición de productos de transformación. Puede resultar necesario aplicar dosis superiores (por ejemplo, 10 veces más) cuando las concentraciones de la sustancia de ensayo estén próximas a los límites de detección al inicio del estudio y/o cuando no puedan detectarse fácilmente productos de transformación importantes que estén presentes al 10 % de la tasa de aplicación de la sustancia de ensayo. Sin embargo, si se usan concentraciones de ensayo más altas, no deberán tener un efecto perjudicial significativo en la actividad microbiana del sistema sedimento-agua. Para conseguir una concentración constante de la sustancia de ensayo en recipientes de diferentes dimensiones puede considerarse adecuado un ajuste según la cantidad del material aplicado, basándose en la altura de la columna de agua en el recipiente en relación con la profundidad del agua en el campo (que se supone que es 100 cm, aunque pueden utilizarse otras alturas). En el anexo 4 se da un ejemplo de cálculo.

El procedimiento ideal es aplicar la sustancia de ensayo como una solución acuosa en la fase acuosa del sistema de ensayo. Si es inevitable, se permite el uso de cantidades pequeñas de disolventes miscibles con agua (como la acetona y el etanol) para la aplicación y distribución de la sustancia de ensayo, pero estas cantidades no deben superar el 1 % v/v ni tener efectos perjudiciales para la actividad microbiana del sistema de ensayo. Debe procederse con cuidado al generar la solución acuosa de la sustancia de ensayo: puede resultar necesario utilizar aparatos de columnas y pre-mezclado para asegurar una homogeneidad completa. Tras añadir la solución acuosa al sistema de ensayo, se recomienda mezclar suavemente la fase acuosa, removiendo el sedimento lo menos posible.

No se recomienda por lo general el uso de productos formulados ya que los ingredientes de la fórmula pueden afectar a la distribución de la sustancia de ensayo y/o los productos de transformación entre las fases acuosa y sedimentaria. No obstante, en el caso de sustancias de ensayo poco solubles en agua, su utilización puede constituir una alternativa apropiada.

El número de recipientes de incubación depende del número de tiempos de muestreo (véase el punto 1.9.3). Debe incluirse un número suficiente de sistemas de ensayo de manera que puedan sacrificarse dos sistemas en cada tiempo de muestreo. Cuando se empleen unidades de control de cada sistema de sedimento acuático, estas no deben tratarse con la sustancia de ensayo. Las unidades de control pueden utilizarse para determinar la biomasa microbiana del sedimento y el carbono orgánico total del agua y del sedimento al final del estudio. Dos de las unidades de control (es decir, una unidad de control de cada sedimento acuático) pueden utilizarse para controlar los parámetros requeridos en el sedimento y el agua durante el período de aclimatación (véase el cuadro del punto 1.8.2.2). Hay que incluir dos unidades de control adicionales en caso de que la sustancia de ensayo se aplique mediante un disolvente para medir los efectos negativos del sistema de ensayo en la actividad microbiana.

▼B

1.9.3 **Duración del ensayo y muestreo**

La duración del experimento no superará normalmente los 100 días (6). El experimento ha de continuar hasta que queden establecidas la vía de degradación y el modelo de distribución sedimento/agua o cuando el 90 % de la sustancia de ensayo se haya disipado por transformación y/o volatilización. El número de tiempos de muestreo debe ser seis, como mínimo, (incluido el tiempo 0), teniendo en cuenta que deberá hacerse un estudio opcional preliminar (véase el punto 1.9.4) para establecer un régimen de muestreo adecuado y la duración del ensayo, a menos que se disponga de datos suficientes sobre la sustancia de ensayo a partir de estudios previos. Para las sustancias de ensayo hidrofóbicas, puede ser necesaria la inclusión de otros puntos de muestreo durante el período inicial del estudio a fin de determinar la tasa de distribución entre las fases acuosa y sedimentaria.

Puede ser útil un ensayo con una segunda concentración para sustancias químicas que lleguen a las aguas superficiales por diferentes vías de entrada en concentraciones significativamente diferentes, siempre que la concentración más baja pueda analizarse con suficiente exactitud. A los tiempos de muestreo adecuados, se separan los recipientes de incubación completos (copias) para su análisis. Se analizan por separado el sedimento y el agua que sobrenada ([1]). El agua superficial tiene que separarse con cuidado procurando remover el sedimento lo menos posible. La extracción y caracterización de la sustancia de ensayo y los productos de transformación deben hacerse conforme a procedimientos analíticos adecuados. Se pondrá cuidado en separar el material que pueda haber sido adsorbido en el recipiente de incubación o los tubos de interconexión utilizados para atrapar sustancias volátiles.

1.9.4 **Ensayo preliminar opcional**

Si no puede calcularse la duración ni el régimen de muestreo a partir de otros estudios sobre la sustancia de ensayo, puede resultar adecuado un ensayo preliminar opcional, que debe hacerse en las mismas condiciones de ensayo propuestas para el estudio definitivo. Si se lleva a cabo el ensayo preliminar, se informará brevemente sobre sus condiciones experimentales y sus resultados.

1.9.5 **Mediciones y análisis**

Se medirá y se indicará la concentración de la sustancia de ensayo y los productos de transformación en cada tiempo de muestreo en el agua y el sedimento (como, concentración y como porcentaje de la sustancia aplicada). En general, deberán identificarse los productos de transformación detectados a >10 % de la radiactividad aplicada en todo el sistema agua-sedimento en cualquier tiempo de muestreo, a no ser que esté razonablemente justificado no hacerlo. Habrá de tomarse en consideración la identificación de los productos de transformación cuyas concentraciones aumenten continuamente durante el estudio, aunque las concentraciones no superen los límites indicados anteriormente, ya que este aumento puede indicar persistencia. Este aspecto se considerará caso por caso, justificándolo debidamente en el informe.

Los resultados de los sistemas de fijación de gases/sustancias volátiles (CO_2 y otros, por ejemplo, compuestos orgánicos volátiles) deberán indicarse en cada tiempo de muestreo. Se indicarán las tasas de mineralización. Asimismo, se indicarán los residuos no extraíbles (ligados) en el sedimento en cada punto de muestreo.

([1]) Cuando pueda darse fácilmente una reoxidación rápida de los productos de la transformación anaerobia, se mantendrán las condiciones anaerobias durante el muestreo y el análisis.

▼B

2 **RESULTADOS**

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

En cada tiempo de muestreo se calculará el balance total de materia o la recuperación (véase el punto 1.7.1) de la radiactividad añadida. Los resultados deberán indicarse en porcentaje de la radiactividad añadida. La distribución de la radiactividad entre el agua y el sedimento se expresará en concentraciones y porcentajes en cada tiempo de muestreo.

La semivida, el DT_{50} y, en su caso, el DT_{75} y el DT_{90} deberán calcularse junto con sus límites de confianza (véase el punto 1.7.3) Podrá obtenerse información sobre la tasa de disipación de la sustancia de ensayo en el agua y el sedimento mediante el uso de instrumentos de evaluación adecuados. Estos instrumentos pueden ir desde la aplicación de cinética de pseudo primer orden a técnicas empíricas de ajuste de curvas con soluciones gráficas o numéricas y evaluaciones más complejas utilizando; por ejemplo, modelos unicompartimentales o multicompartimentales. Para más información puede consultarse la bibliografía correspondiente (35) (36) (37).

Todos los planteamientos al respecto tienen sus ventajas e inconvenientes y varían considerablemente en cuanto a complejidad. El supuesto de una cinética de primer orden puede ser una simplificación excesiva de los procesos de degradación y distribución, pero, cuando es posible, da un término (constante de velocidad o semivida) que es fácilmente comprensible y valioso en la modelización por simulación y en los cálculos de las concentraciones previstas en el medio ambiente. Los planteamientos empíricos o las transformaciones lineales pueden dar lugar a un mejor ajuste de las curvas a los datos y, por tanto, permitir una mejor estimación de las semividas, los valores DT_{50} y, en su caso, los DT_{75} y DT_{90}. Sin embargo, el uso de las constantes derivadas es limitado. Los modelos compartimentales pueden generar una serie de constantes de valor útiles en la evaluación de riesgos que describen la velocidad de degradación en diferentes compartimentos y la distribución de la sustancia química. Asimismo, estos modelos deben utilizarse para el cálculo de constantes de velocidad en la formación y degradación de los principales productos de transformación. En todos los casos, el método elegido debe justificarse y el experimentador ha de demostrar gráfica o estadísticamente la corrección del ajuste.

3 **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe debe comprender la siguiente información:

Sustancia de ensayo:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador cuando se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés,

— pureza (impurezas) de la sustancia de ensayo,

— pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad molar (si procede).

▼B

Sustancias de referencia:

— nombre químico y estructura de las sustancias de referencia utilizadas para caracterizar y/o identificar los productos de transformación.

Sedimentos y aguas del ensayo:

— ubicación y descripción de los lugares donde se han tomado las muestras de sedimentos acuáticos incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación,

— toda la información sobre la recogida, almacenamiento (si lo hay) y aclimatación de los sistemas agua- sedimento,

— características de las muestras agua-sedimento según lo indicado en el cuadro del punto 1.8.2.2.

Condiciones de ensayo:

— sistema de ensayo utilizado (por ejemplo, sistema de flujo, sistema biométrico, forma de ventilación, método de agitado, volumen de agua, masa del sedimento, grosor de la capa de sedimento y agua, dimensión del recipiente de prueba, etc.),

— aplicación de la sustancia de ensayo al sistema de ensayo: concentración de ensayo utilizada, número de copias y testigos, forma de aplicación de la sustancia de ensayo (por ejemplo, utilización de disolventes, en su caso) etc.,

— temperatura de incubación,

— tiempos de muestreo,

— métodos de extracción y sus rendimientos, así como métodos analíticos y límites de detección,

— métodos de caracterización/identificación de productos de transformación,

— desviaciones del protocolo de ensayo o de las condiciones de ensayo durante el estudio.

Resultados:

— cifras en bruto de los análisis representativos (todos los datos en bruto tienen que almacenarse en el archivo BPL),

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— tasas de recuperación (en el punto 1.7.1 se dan los valores porcentuales para un estudio válido),

— tablas de resultados expresada en % de la dosis aplicada y en $mg.kg^{-1}$ en el agua, el sedimento y el sistema completo (solo %) para la sustancia de ensayo y, si procede, para los productos de transformación y la radiactividad no extraíble,

— balance de materia durante y al final de los estudios,

— representación gráfica de la transformación en las fracciones acuosa y sedimentaria y en el sistema completo (incluida la mineralización),

— tasas de mineralización,

▼B

— semivida, DT50, y, en su caso, DT_{75} y DT_{90} de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación, incluyendo límites de confianza en el agua, el sedimento y el sistema completo,

— valoración de la cinética de transformación de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación,

— vía de transformación propuesta, si procede,

— discusión de los resultados.

REFERENCIAS

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993.Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on micTobial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, G, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

Anexo 1

DIRECTRIZ SOBRE LOS SISTEMAS DE ENSAYO AEROBIOS Y ANAEROBIOS

Sistema de ensayo aerobio

El sistema de ensayo aerobio descrito en este método de ensayo consiste en una capa de agua aerobia (cuyas concentraciones de oxígeno oscilan normalmente entre 7 y 10 mg l-1) y una capa de sedimento, aerobio en la superficie y anaerobio por debajo de la superficie (cuyos potenciales redox medios (Eh) oscilan normalmente en la zona anaerobia del sedimento entre - 80 y - 190 mV). Se hará circular aire húmedo sobre la superficie del agua en cada unidad de incubación para mantener suficiente oxígeno en el espacio libre.

Sistema de ensayo anaerobio

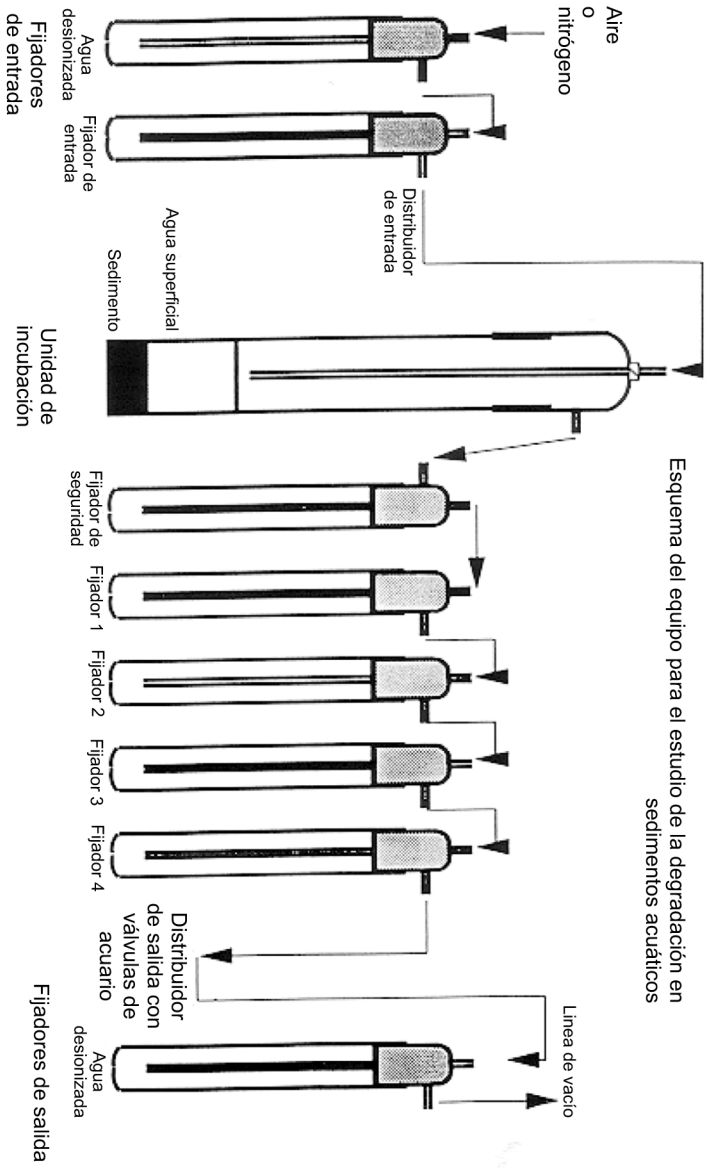
Para el sistema de ensayo anaerobio, el procedimiento del ensayo es esencialmente el mismo que el descrito para el sistema aerobio con la excepción de que el nitrógeno humedecido se pasa por la superficie del agua en cada unidad de incubación para mantener un espacio libre de nitrógeno. El sedimento y el agua se consideran anaerobios cuando el potencial redox (Eh) sea inferior a - 100 mV.

En el ensayo anaerobio, la valoración de la mineralización incluye la medición del dióxido de carbono y el metano liberados.

▼B

Anexo 2

EJEMPLO DE APARATO DE RUJO

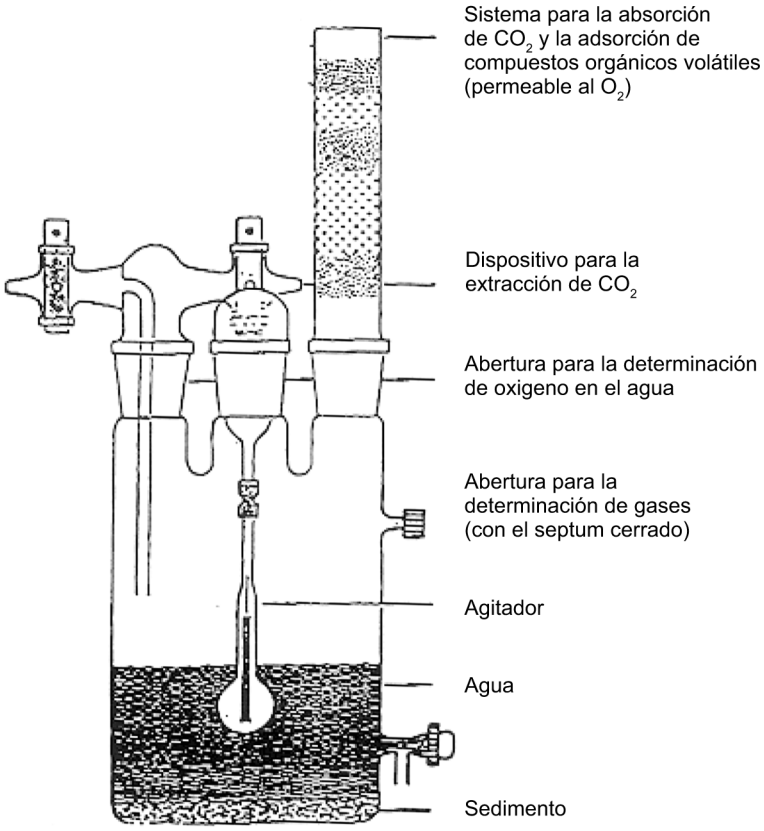


Fijador de seguridad vacío
Fijador 1:
etileno glicol para la fijación de compuestos orgánicos volátiles
Fijador 2:
ácido sulfúrico 0,1 M para la fijación de compuestos volátiles alcalinos
Fijadors 3 y 4:
hidróxido de sodio 2M para la fijación de CO_2 y otros compuestos volátiles ácidos

▼B

Anexo 3

EJEMPLO DE APARATO BIOMÉTRICO



▼B

Anexo 4

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA DOSIS QUE DEBE APLICARSE A LOS RECIPIENTES DE ENSAYO

Diámetro interno del cilindro:	= 8 cm
Altura de la columna de agua sin incluir el sedimento:	= 12 cm
Área de la superficie: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Tasa de aplicación: 500 g de la sustancia de ensayo/ha corresponde a 5 $\mu g/cm^2$	
Total µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Ajuste de la cantidad en relación con una altura de 100 cm.	
$12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Volumen de la columna de agua: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Concentración en el agua: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 |µg/ml o 50 µg/1

▼M1

C.25. MINERALIZACIÓN AEROBIA EN AGUAS SUPERFICIALES. ENSAYO DE SIMULACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN

1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este ensayo es medir la evolución temporal de la biodegradación de una sustancia problema a baja concentración en agua natural aerobia y cuantificar las observaciones en forma de expresiones cinéticas de velocidad. Este ensayo de simulación consiste en un ensayo discontinuo en matraces agitados en el laboratorio para determinar velocidades de biodegradación aerobia de sustancias orgánicas en muestras de aguas superficiales naturales (agua dulce, salobre o salada). Se basa en la norma ISO/DIS 14592-1 (2) e incluye también elementos de los métodos de ensayo C.23 y C.24 (3) (4). Cuando la duración del ensayo es larga, se puede optar por un procedimiento semicontinuo en lugar del discontinuo, con el fin de evitar el deterioro del microcosmos de ensayo. El objetivo principal del ensayo de simulación es determinar la mineralización de la sustancia problema en las aguas superficiales, y la mineralización constituye la base para expresar la cinética de degradación. Sin embargo, un posible objetivo secundario del ensayo es obtener información sobre la degradación primaria y la formación de los productos de transformación importantes. La identificación de los productos de transformación y, a ser posible, la cuantificación de sus concentraciones son especialmente importantes en el caso de las sustancias que se mineralizan muy despacio (por ejemplo, con vidas medias del ^{14}C total residual superiores a 60 días). Normalmente deben utilizarse concentraciones más elevadas de sustancia problema (por ejemplo, > 100 μg/l) para la identificación y cuantificación de los productos de transformación importantes, debido a las limitaciones analíticas.

Una baja concentración en este ensayo significa una concentración (por ejemplo, de menos de 1 μg/l a 100 μg/l) lo suficientemente baja para garantizar que la cinética de biodegradación obtenida en el ensayo refleja la cinética prevista en el medio ambiente. Comparada con la masa total de sustratos carbonados biodegradables presentes en el agua natural utilizada en el ensayo, la sustancia problema presente a concentración baja servirá de sustrato secundario. Esto significa que la cinética de biodegradación prevista es de primer orden (cinética independiente del «crecimiento») y que la sustancia problema puede degradarse por «cometabolismo». Una cinética de primer orden significa que la velocidad de degradación (mg/l/día) es proporcional a la concentración de sustrato, que se va reduciendo a lo largo del tiempo. Con una cinética realmente de primer orden, la constante específica de velocidad de degradación, k, es independiente del tiempo y de la concentración; es decir, k no varía apreciablemente a lo largo de la duración de un experimento y no cambia con la concentración añadida entre experimentos. Por definición, la constante específica de velocidad de degradación es igual al cambio relativo de concentración por unidad de tiempo: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Aunque en las condiciones establecidas lo previsible normalmente es una cinética de primer orden, puede haber circunstancias en que sea más adecuada otra cinética. Por ejemplo, pueden observarse desviaciones de la cinética de primer orden si la velocidad de biotransformación está limitada por fenómenos de transferencia de masas, como la velocidad de difusión, más que por la velocidad de reacción biológica. Sin embargo, los datos pueden describirse casi siempre con una cinética de pseudoprimer orden si se acepta una constante de velocidad dependiente de la concentración.

▼M1

Para facilitar el establecimiento del diseño experimental e interpretar los resultados, antes del ensayo debe disponerse de información sobre la biodegradabilidad de la sustancia problema a concentraciones más elevadas (por ejemplo, datos procedentes de ensayos preliminares) y de información sobre la degradabilidad abiótica, los productos de transformación y las propiedades fisicoquímicas pertinentes. El uso de sustancias problema marcadas con ^{14}C y la determinación de la distribución de fases del ^{14}C al final del ensayo permiten la determinación de la biodegradabilidad final. Cuando se utilice una sustancia problema no marcada, la biodegradación final solo se podrá estimar si se estudia una concentración superior y se conocen todos los productos de transformación mayoritarios.

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

Biodegradación primaria: el cambio estructural (transformación) de una sustancia química por microorganismos con el resultado de pérdida de la identidad química.

Biodegradación funcional: el cambio estructural (transformación) de una sustancia química por microorganismos con el resultado de pérdida de una propiedad específica.

Biodegradación aerobia final: la descomposición de una sustancia química por microorganismos en presencia de oxígeno hasta dar dióxido de carbono, agua y sales minerales de cualquier otro elemento presente (mineralización) y la producción de nueva biomasa y productos orgánicos de biosíntesis microbiana.

Mineralización: la descomposición de una sustancia química o materia orgánica por microorganismos en presencia de oxígeno hasta dar dióxido de carbono, agua y sales minerales de cualquier otro elemento presente.

Tiempo de latencia: el tiempo comprendido desde el inicio de un ensayo hasta que se consigue la adaptación de los microorganismos de degradación y aumenta hasta un nivel detectable el grado de biodegradación de una sustancia química o materia orgánica (por ejemplo, hasta el 10 % de la biodegradación teórica máxima, o menos, en función de la exactitud de la técnica de medición).

Nivel máximo de biodegradación: el grado de biodegradación de una sustancia química o materia orgánica presente en un ensayo, expresado en porcentaje, por encima del cual no se produce más biodegradación durante el ensayo.

Sustrato primario: el conjunto de fuentes naturales de carbono y energía que permiten el crecimiento y mantenimiento de la biomasa microbiana.

Sustrato secundario: un componente del sustrato presente en una concentración tan baja que mediante su degradación solo se proporcionan a los microorganismos competentes cantidades insignificantes de carbono y energía, en comparación con el carbono y la energía suministrados por la degradación de los componentes del sustrato principal (sustratos primarios).

Constante de velocidad de degradación: una constante cinética de velocidad de primer orden o pseudoprimer orden, k (d^{-1}), que indica la velocidad de los procesos de degradación. En caso de experimento discontinuo, k se estima basándose en la parte inicial de la curva de degradación obtenida tras el final del tiempo de latencia.

▼M1

Vida media, $t_{1/2}$ (d): el término utilizado para caracterizar la velocidad de una reacción de primer orden, consistente en el intervalo de tiempo que corresponde a una reducción de la concentración a la mitad. La vida media y la constante de velocidad de degradación están relacionadas por la ecuación $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Vida media de degradación, DT_{50} (d): el término utilizado para cuantificar el resultado de los ensayos de biodegradación, consistente en el intervalo de tiempo, incluido el de latencia, necesario para alcanzar el 50 % de biodegradación.

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOC): el límite de detección (LOD) es la concentración de una sustancia por debajo de la cual no se puede distinguir la identidad de la sustancia de la de artefactos analíticos; el límite de cuantificación (LOC) es la concentración de una sustancia por debajo de la cual no puede determinarse dicha concentración con una exactitud aceptable.

Carbono orgánico disuelto (COD): la parte del carbono orgánico presente en una muestra de agua que no puede eliminarse por una separación de fases especificada como, por ejemplo, mediante centrifugación a 40 000 ms^{-2} durante 15 min o mediante filtración por membrana con poros de 0,2 μm a 0,45 μm de diámetro.

Actividad del ^{14}C orgánico total (AOT): la actividad total del ^{14}C relacionada con el carbono orgánico.

Actividad del ^{14}C orgánico disuelto (AOD): la actividad total del ^{14}C relacionada con el carbono orgánico disuelto.

Actividad del ^{14}C orgánico particulado (AOP): la actividad total del ^{14}C relacionada con el carbono orgánico particulado.

1.3. APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El ensayo de simulación es aplicable a sustancias orgánicas no volátiles o débilmente volátiles estudiadas a bajas concentraciones. En la práctica, si se utilizan matraces abiertos a la atmósfera (por ejemplo, con tapón de algodón), puede considerarse que no son volátiles las sustancias que tienen constantes de la ley de Henry inferiores a aproximadamente 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (unas 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$). Si se utilizan matraces cerrados con cámara de aire, es posible estudiar sustancias ligeramente volátiles (con constantes de la ley de Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ o $< 10^{-3}$ $atm \cdot m^3/mol$) sin pérdidas del sistema de ensayo. Puede haber pérdidas de sustancias marcadas con ^{14}C, si no se toman las debidas precauciones, cuando se elimina el CO_2. En tales situaciones, puede ser necesario atrapar el CO_2 en un absorbente interno con álcali o utilizar un sistema externo de absorción de CO_2 (determinación directa de $^{14}CO_2$; véase el apéndice 3). Para determinar la cinética de la biodegradación, la concentración de la sustancia problema debe ser inferior a su hidrosolubilidad. Sin embargo, ha de señalarse que los valores de hidrosolubilidad que se encuentran en la bibliografía pueden ser bastante más elevados que la solubilidad de la sustancia problema en aguas naturales. También es posible establecer la solubilidad de sustancias problema especialmente poco hidrosolubles utilizando las aguas naturales que son objeto del estudio.

El método puede utilizarse para simular la biodegradación en aguas superficiales libres de partículas gruesas (ensayo pelágico) o en aguas superficiales turbias que puede haber, por ejemplo, cerca de la interfaz agua/sedimento (ensayo con sedimento en suspensión).

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo se efectúa de forma discontinua incubando la sustancia problema solo con agua superficial (ensayo pelágico) o con agua superficial a la que se ha añadido sedimento/sólidos en suspensión a la concentración de 0,01 a 1 g/l en peso seco (ensayo con sedimento en suspensión) para simular una masa de agua con sólidos en suspensión o con sedimento resuspendido. La concentración de sedimento/sólidos en suspensión en la parte inferior de este intervalo es representativa de la mayoría de las aguas superficiales. Los matraces de ensayo se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente, en condiciones aerobias y con agitación. Para determinar la cinética de degradación deben utilizarse al menos dos concentraciones diferentes de sustancia problema. Las concentraciones deben estar separadas por un factor de entre 5 y 10, y representar el intervalo de concentraciones previsto en el medio ambiente. La concentración máxima de la sustancia problema no debe superar los 100 μg/l, pero es preferible utilizar una concentración máxima en el ensayo por debajo de 10 μg/l o menos, para tener la certeza de que la biodegradación sigue una cinética de primer orden. La concentración mínima no debe superar los 10 μg/l, pero es preferible que sea del orden de 1 a 2 μg/l o incluso inferior a 1 μg/l. Normalmente puede efectuarse un análisis adecuado de concentraciones tan bajas utilizando sustancias marcadas con ^{14}C disponibles en el mercado. Debido a las limitaciones analíticas, con frecuencia resulta imposible medir la concentración de la sustancia problema con la exactitud exigida si dicha concentración es ≤ 100 μg/l (véase el párrafo segundo del punto 1.7.2). Pueden emplearse concentraciones superiores de sustancia problema (> 100 μg/l y a veces > 1 mg/l) para la identificación y cuantificación de los productos de transformación mayoritarios o si no se dispone de un método específico de análisis con un límite de detección bajo. Si se estudian concentraciones elevadas de sustancia problema, quizás sea imposible utilizar los resultados para estimar la constante de degradación de primer orden y la vida media, ya que probablemente la degradación no va a seguir una cinética de primer orden.

La degradación se va estudiando a intervalos adecuados, midiendo el ^{14}C residual o la concentración residual de sustancia problema si se utiliza un análisis químico específico. El marcado con ^{14}C de la parte más estable de la molécula permite la determinación de la mineralización total, mientras que el marcado con ^{14}C de una parte menos estable de la molécula, así como el uso de análisis específicos, permite la evaluación de solo la biodegradación primaria. Sin embargo, la parte más estable no incluye necesariamente la fracción funcional pertinente de la molécula (que puede relacionarse con una propiedad específica, como toxicidad, bioacumulación, etc.). En tal caso, puede ser apropiado utilizar una sustancia problema marcada con ^{14}C en la parte funcional para estudiar la eliminación de la propiedad específica.

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

En este ensayo pueden utilizarse sustancias problema tanto radiomarcadas como sin marcar. Se recomienda la técnica del marcado con ^{14}C, normalmente en la parte o partes más estables de la molécula (véase también el punto 1.4). En el caso de sustancias que contienen más de un anillo aromático, es preferible que estén marcados con ^{14}C uno o más carbonos de cada anillo. Por otra parte, es aconsejable que estén marcados con ^{14}C uno o varios carbonos a cada lado de los enlaces fácilmente degradables. La pureza química y/o radioquímica de la sustancia problema debe ser > 95 %. En caso de sustancias radiomarcadas, se recomienda una actividad específica de unos 50 μCi/mg (1,85 MBq) o más, a fin de facilitar las mediciones de ^{14}C en ensayos efectuados con bajas concentraciones iniciales. Debe disponerse de la siguiente información sobre la sustancia problema:

▼**M1**

— hidrosolubilidad [Método A.6],

— solubilidad en disolventes orgánicos (sustancias aplicadas con disolventes o con baja hidrosolubilidad),

— constante de disociación (pKa) si es fácil que la sustancia tome o pierda protones [OCDE TG 112] (5),

— presión de vapor [Método A.4] y constante de la ley de Henry,

— estabilidad química en el agua y en la oscuridad (hidrólisis) [Método C.7].

Cuando se estudian en agua de mar sustancias poco hidrosolubles, puede ser útil conocer también el parámetro del efecto salino (o «constante de Setschenow») K^s, definida por la expresión siguiente: $\log (S/S') = K^s C_m$, donde S y S' son la solubilidad de la sustancia en agua dulce y agua de mar, respectivamente, y C_m es la concentración molar de sales.

Si el ensayo se realiza como «ensayo con sedimento en suspensión», debe disponerse asimismo de la información siguiente:

— coeficiente de reparto n-octanol/agua [Método A.8],

— coeficiente de adsorción [Método C.18].

Los siguientes datos también pueden ser útiles:

— concentración en el medio ambiente (valor conocido o estimación),

— toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos [Método C.11],

— biodegradabilidad fácil o inherente [Métodos C.4 A-F, C.12, C.9, OCDE TG 302 (5)],

— estudios de biodegradabilidad aerobia o anaerobia en el suelo y transformación en sedimentos/agua [Métodos C.23, C.24].

1.6. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Debe utilizarse como sustancia de referencia una sustancia que normalmente se degrade con facilidad en condiciones aerobias (por ejemplo, anilina o benzoato de sodio). Normalmente, el tiempo previsto de degradación de la anilina y del benzoato de sodio es inferior a 2 semanas. El objeto de las sustancias de referencia es garantizar que la actividad microbiana del agua estudiada esté dentro de ciertos límites; es decir, que el agua contenga una población microbiana activa.

▼M1

1.7. CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1. **Recuperación**

Inmediatamente tras la adición de la sustancia problema, debe verificarse cada concentración inicial de ensayo midiendo la actividad de ^{14}C, o efectuando análisis químicos en caso de sustancias sin marcar, en muestras al menos duplicadas. Así se obtiene información sobre la aplicabilidad y repetibilidad del método analítico y sobre la homogeneidad de la distribución de la sustancia problema. Normalmente, el valor de actividad de ^{14}C o de concentración de sustancia problema medido al principio se utiliza en los análisis posteriores de los datos en vez de la concentración nominal, ya que así se compensan las pérdidas debidas a la adsorción y los errores de dosificación. En caso de sustancia problema marcada con ^{14}C, el nivel de recuperación al final del experimento viene dado por el balance de masas (véase el último párrafo del punto 1.8.9.4). Lo ideal es que el balance de masa con marcado radiactivo esté entre el 90 y el 110 %, mientras que la exactitud analítica debe llevar a una recuperación inicial de entre el 70 y el 110 % con sustancias problema sin marcar. Estos intervalos deben interpretarse como objetivos y no utilizarse como criterios de aceptación del ensayo. También se puede determinar la exactitud analítica con la sustancia problema a una concentración inferior a la inicial y con los productos de transformación mayoritarios.

1.7.2. **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método analítico (incluida la eficiencia de la extracción inicial) para cuantificar la sustancia problema y, en su caso, los productos de transformación debe comprobarse analizando cinco réplicas de los distintos extractos del agua superficial.

Siempre que sea posible, el límite de detección (LOD) del método analítico con la sustancia problema y con los productos de transformación debe ser el 1 % o menos de la cantidad inicial utilizada en el sistema de ensayo. El límite de cuantificación (LOC) debe ser igual o inferior al 10 % de la concentración utilizada. Los análisis químicos de muchas sustancias orgánicas y de sus productos de transformación exigen con frecuencia que la sustancia problema se aplique en concentraciones relativamente elevadas, es decir, > 100 µg/l.

1.8. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.8.1. **Equipo**

El ensayo puede realizarse en matraces Erlenmeyer o en vasos cilíndricos de la capacidad adecuada (por ejemplo, 0,5 o 1,0 litros) cerrados con tapones de silicona o caucho, o en matraces de suero con tapas herméticas al CO_2 como, por ejemplo, diafragmas de caucho butílico. Otra posibilidad es efectuar el ensayo utilizando varios matraces y recoger matraces enteros, al menos por duplicado, en cada intervalo de muestreo (véase el último párrafo del punto 1.8.9.1). Si las sustancias problema no son volátiles ni están radiomarcadas, no será necesario utilizar tapones ni tapas herméticos a los gases, y será suficiente con tapones de algodón flojos que impidan la entrada de contaminación desde el aire (véase el párrafo segundo del punto 1.8.9.1). Las sustancias químicas ligeramente volátiles deben ensayarse en un sistema biométrico con agitación suave de la superficie del agua. Para asegurarse de que no se produce contaminación bacteriana, se puede optar por esterilizar los recipientes calentándolos o pasándolos por autoclave antes de utilizarlos. Además se utilizará el siguiente equipo normal de laboratorio:

— plataforma de agitación o agitadores magnéticos para la agitación continua de los matraces de ensayo,

▼M1

— centrifugadora,

— pH metro,

— turbidímetro para mediciones de turbidez nefelométrica,

— estufa u horno microondas para determinaciones del peso seco,

— equipo de filtración por membrana,

— autoclave o estufa para esterilización de material de vidrio por calor,

— instalaciones para la manipulación de sustancias marcadas con ^{14}C,

— equipo para cuantificar la actividad de ^{14}C en muestras de soluciones de captura de CO_2 y, en caso necesario, en muestras de sedimento,

— equipo analítico para la determinación de la sustancia problema (y de referencia) si se utiliza un análisis químico específico (por ejemplo, cromatógrafo de gases, cromatógrafo de líquidos de alta presión).

1.8.2. **Soluciones madre de sustancia problema**

Se utiliza agua desionizada para preparar las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia (véase el párrafo primero del punto 1.8.7). El agua desionizada estará libre de sustancias que puedan ser tóxicas para los microorganismos, y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) no será mayor de 1 mg/l (6).

1.8.3. **Recogida y transporte del agua superficial**

El lugar de muestreo para la recogida del agua superficial se seleccionará de acuerdo con el objetivo del ensayo en cada caso. Al seleccionar los lugares de muestreo se atenderá a los antecedentes de posibles aportes de material agrícola, industrial o doméstico. Si se sabe que un entorno acuático ha sido contaminado con la sustancia problema o sus análogos estructurales en los cuatro años anteriores, no se utilizará para la recogida de agua para el ensayo, salvo que lo que se pretenda sea precisamente investigar las velocidades de degradación en lugares previamente expuestos. Se medirán en el lugar de recogida tanto el pH como la temperatura del agua. Por otra parte, se anotarán la profundidad del muestreo y el aspecto de la muestra de agua (por ejemplo, color y turbidez) (véase el punto 3). Deben medirse la concentración de oxígeno y el potencial redox del agua y de la capa superficial de los sedimentos, a fin de demostrar la presencia de condiciones aerobias, salvo que sea evidente a partir del aspecto y de los datos anteriores sobre el mismo lugar. El agua superficial debe transportarse en un recipiente limpiado a fondo. Durante el transporte, la temperatura de la muestra no deberá superar significativamente la temperatura que se vaya a utilizar en el ensayo. Se recomienda refrigerar a 4 °C si el transporte va a durar más de 2 o 3 horas. No debe congelarse la muestra de agua.

▼M1

1.8.4. **Conservación y preparación del agua superficial**

El ensayo debe iniciarse preferentemente en el plazo de un día desde la recogida de la muestra. En caso necesario, el agua puede conservarse durante un tiempo que debe reducirse al mínimo, sin superar en ningún caso las 4 semanas. La muestra de agua se mantendrá a 4 °C con aireación hasta su utilización. Antes de utilizarse, se retirarán las partículas gruesas, por ejemplo mediante paso por filtro de nailon con una luz de malla aproximada de 100 μm o por papel de filtro grueso, o mediante sedimentación.

1.8.5. **Preparación del agua con adición de sedimento (opcional)**

Para el ensayo con sedimento en suspensión, se añade sedimento superficial a los matraces que contienen agua natural (filtrada para retirar las partículas gruesas como se describe en el punto 1.8.4) a fin de obtener una suspensión; la concentración de sólidos en suspensión debe estar entre 0,01 y 1 g/l. El sedimento superficial debe proceder del mismo lugar del que se haya tomado la muestra de agua. En función del entorno acuático de que se trate, el sedimento superficial puede caracterizarse por un elevado contenido de carbono orgánico (2,5 a 7,5 %) y una textura fina o bien por un bajo contenido de carbono orgánico (0,5 a 2,5 %) y una textura gruesa (3). El sedimento superficial puede prepararse de la forma siguiente: se extraen varias calas de sedimento utilizando un tubo de plástico transparente, se separan las capas aerobias superiores (desde la superficie hasta una profundidad máxima de 5 mm) inmediatamente después de la extracción y se juntan todas. La muestra de sedimento así obtenida se transporta en un recipiente con una gran cámara de aire para mantener el sedimento en condiciones aerobias (y refrigerado a 4 °C si la duración del transporte supera las 2 o 3 horas). La muestra de sedimento debe suspenderse en el agua del ensayo en la proporción de 1:10 y mantenerse a 4 °C con aireación hasta su utilización. En caso necesario, el sedimento puede conservarse durante un tiempo que debe reducirse al mínimo, sin superar en ningún caso las 4 semanas.

1.8.6. **Procedimiento semicontinuo (facultativo)**

Puede ser necesaria una incubación prolongada (varios meses) si hay un largo tiempo de latencia antes de que se pueda medir una degradación significativa de la sustancia problema. Si esto se sabe por ensayos anteriores efectuados con la sustancia, el ensayo puede iniciarse con un procedimiento semicontinuo que permita la renovación periódica de una parte del agua o suspensión de ensayo (véase el apéndice 2). Otra posibilidad es pasar el ensayo discontinuo normal a ensayo semicontinuo si al cabo de unos 60 días de seguir el procedimiento discontinuo no se aprecia ninguna degradación de la sustancia problema (véase el párrafo segundo del punto 1.8.8.3).

1.8.7. **Adición de la sustancia problema (o de referencia)**

En el caso de sustancias con elevada hidrosolubilidad (> 1 mg/l) y baja volatilidad (constantes de la ley de Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ o < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), puede prepararse una solución madre en agua desionizada (véase el punto 1.8.2); después se añade el volumen adecuado de la solución madre a los recipientes de ensayo para conseguir la concentración deseada. El volumen de las eventuales soluciones madre añadidas debe mantenerse en el mínimo posible (< 10 % del volumen final de líquido, a ser posible). Otro procedimiento es disolver la sustancia problema en un volumen mayor de agua de ensayo, lo que puede considerarse como un alternativa al uso de disolventes orgánicos.

▼M1

Si no hay otra posibilidad, se prepararán soluciones madre de las sustancias no volátiles con escasa hidrosolubilidad utilizando un disolvente orgánico volátil, pero la cantidad de disolvente añadido al sistema de ensayo no debe superar el 1 % v/v ni tener efectos adversos sobre la actividad microbiana. El disolvente no debe afectar a la estabilidad de la sustancia problema en el agua. El disolvente debe eliminarse para que no quede más que una pequeñísima cantidad, a fin de que no aumente significativamente la concentración de COD en el agua o suspensión de ensayo. Esto debe comprobarse realizando un análisis específico de la sustancia o, a ser posible, un análisis de COD (6). Ha de tenerse cuidado para limitar la cantidad de disolvente transferido al mínimo absolutamente necesario, y velar por que toda la cantidad de sustancia problema pueda disolverse en el volumen final de agua de ensayo. Pueden utilizarse otras técnicas para introducir la sustancia problema en los recipientes de ensayo, como se describe en las referencias (7) y (8). Cuando se utilice un disolvente orgánico para introducir la sustancia problema, habrá unos controles de disolvente, que contendrán agua de ensayo (sin añadidos) y agua de ensayo con la sustancia de referencia añadida y se tratarán de forma similar a los recipientes de ensayo activo en los que se introduce la sustancia problema disuelta en el disolvente. El objeto de los controles de disolvente consiste en examinar los posibles efectos negativos causados por el disolvente en la población microbiana, siguiendo la degradación de la sustancia de referencia.

1.8.8. **Condiciones de ensayo**

1.8.8.1. *Temperatura del ensayo*

La incubación debe efectuarse en un lugar de preferencia oscuro, o bien con luz difusa, y a temperatura controlada (± 2 °C), que puede ser la temperatura de campo o una temperatura normal de 20 a 25 °C. La temperatura de campo puede ser la temperatura real de la muestra en el momento del muestreo o la temperatura de campo media del lugar de muestreo.

1.8.8.2. *Agitación*

Debe efectuarse una agitación continua para mantener en suspensión las partículas y microorganismos. La agitación también facilita la transferencia de oxígeno desde la cámara de aire hacia el líquido para mantener unas condiciones aerobias adecuadas. Los matraces se ponen en una plataforma de agitación (de unas 100 rpm) o se utilizan agitadores magnéticos. La agitación debe ser continua. Sin embargo, también debe ser lo más suave posible, siempre que se mantenga una suspensión homogénea.

1.8.8.3. *Duración del ensayo*

La duración del ensayo no debe superar en principio los 60 días, salvo que se siga un procedimiento semicontinuo con renovación periódica de la suspensión de ensayo (véanse el punto1.8.6 y el apéndice 2). Sin embargo, si en los primeros 60 días se ha iniciado la degradación de la sustancia problema, puede ampliarse hasta un máximo de 90 días la duración del ensayo con un procedimiento discontinuo. Se va siguiendo la evolución de la degradación a intervalos adecuados, determinando la actividad del ^{14}C residual o del $^{14}CO_2$ formado (véase el punto 1.8.9.4) o realizando análisis químicos (véase el punto 1.8.9.5). El período de incubación debe tener la duración suficiente para que se pueda evaluar el proceso de degradación. La amplitud de la degradación debe superar preferentemente el 50 %; en caso de sustancias lentamente degradables, la amplitud de la degradación debe ser suficiente (en principio, más del 20 %) para permitir la estimación de la constante de velocidad de degradación cinética.

▼M1

Deben medirse periódicamente el pH y la concentración de oxígeno en el sistema de ensayo, salvo que la experiencia anterior con ensayos similares de muestras de agua y sedimento tomados del mismo lugar haga innecesarias tales mediciones. En ciertas circunstancias, el metabolismo de sustratos primarios en concentraciones mucho más elevadas en el agua o sedimento podría provocar la formación de CO_2 y el agotamiento del oxígeno en una proporción suficiente para alterar significativamente las condiciones experimentales durante el ensayo.

1.8.9. **Procedimiento**

1.8.9.1. *Preparación de matraces para el ensayo pelágico*

Se pasa un volumen adecuado de agua de ensayo a los matraces, hasta un tercio aproximadamente del volumen de estos, sin bajar de unos 100 ml. Si se utilizan varios matraces (para que se puedan recoger matraces enteros en cada tiempo de muestreo), el volumen adecuado de agua de ensayo será también de unos 100 ml, ya que unos volúmenes pequeños de muestra pueden influir en la duración del tiempo de latencia. La sustancia problema se añade a partir de una solución madre como se describe en los puntos 1.8.2 y 1.8.7. Deben utilizarse al menos dos concentraciones diferentes de sustancia problema, relacionadas por una razón de entre 5 y 10, a fin de determinar la cinética de degradación y calcular la constante de velocidad de degradación cinética. Las dos concentraciones seleccionadas deben estar por debajo de 100 μg/l y lo mejor es que se encuentren en el intervalo de < 1-10 μg/l.

Los matraces se cierran con tapones o tapas impermeables al aire y al CO_2. En caso de sustancias problema no volátiles y no marcadas con ^{14}C, es adecuado utilizar tapones de algodón flojos que impidan la contaminación por el aire (véase el punto 1.8.1), siempre que se sepa que los productos de degradación importantes no son volátiles y si se efectúa una determinación indirecta de CO_2 (véase el apéndice 3).

Los matraces se incuban a la temperatura seleccionada (véase el punto 1.8.8.1). Se toman muestras para el análisis químico o la medición del ^{14}C al inicio del ensayo (es decir, antes de que empiece la degradación; véase el punto 1.7.1) y después a intervalos adecuados a lo largo de la duración del ensayo. El muestreo puede efectuarse retirando submuestras (por ejemplo, alícuotas de 5 ml) de cada réplica o recogiendo matraces enteros en cada tiempo de muestreo. La mineralización de la sustancia problema puede determinarse directa o indirectamente (véase el apéndice 3). Normalmente hace falta un mínimo de cinco puntos de muestreo a lo largo de la fase de degradación (es decir, después del final del tiempo de latencia) para establecer una constante de velocidad fiable, salvo que pueda justificarse que tres puntos de muestreo son suficientes con sustancias rápidamente degradables. En caso de sustancias que no se degradan rápidamente pueden hacerse con facilidad más mediciones durante la fase de degradación y, por tanto, deben utilizarse más puntos para la estimación de k. No puede indicarse un programa fijo de muestreo, ya que la velocidad de biodegradación varía; sin embargo, se recomienda tomar una muestra cada semana si la degradación es lenta. Si la sustancia es rápidamente degradable, el muestreo debe hacerse una vez al día durante los tres primeros días y después cada dos o tres días. En ciertas circunstancias, como cuando las sustancias se hidrolizan muy rápidamente, puede ser necesario tomar muestras cada hora. Se recomienda efectuar un estudio preliminar antes del ensayo para determinar los intervalos de muestreo adecuados. Si hacen falta muestras para otros análisis específicos, se recomienda tomar más muestras y seleccionar después las que vayan a analizarse al final del experimento siguiendo una estrategia hacia atrás, es decir, analizando primero las últimas muestras (véase en el párrafo segundo del punto 1.8.9.5 información sobre la estabilidad de las muestras durante su conservación).

▼M1

1.8.9.2. *Número de matraces y muestras*

Se reserva un número suficiente de matraces de ensayo para los siguientes usos:

— matraces de ensayo; matraces al menos duplicados de cada concentración de sustancia problema (es preferible un mínimo de 3) o varios matraces de ensayo para cada concentración si se van a tomar matraces enteros en cada tiempo de muestreo (símbolo: F_T),

— matraces de ensayo para el cálculo del balance de masas; matraces al menos duplicados de cada concentración de ensayo (símbolo: F_M),

— ensayo en blanco, sin sustancia problema; al menos un matraz para el ensayo en blanco, solo con agua de ensayo (símbolo: F_B),

— control de referencia; matraces duplicados con sustancia de referencia (por ejemplo, anilina o benzoato de sodio, a 10 µg/l) (símbolo: F_C). El objeto del control de referencia es confirmar la presencia de un mínimo de actividad microbiana. Si resulta procedente, puede utilizarse una sustancia de referencia radiomarcada, incluso aunque la degradación de la sustancia problema se vaya siguiendo mediante análisis químicos,

— control estéril; uno o dos matraces con agua de ensayo esterilizada para examinar la posible degradación abiótica u otro tipo de eliminación no biológica de la sustancia problema (símbolo: F_S). La actividad biológica puede interrumpirse pasando por autoclave (121 °C; 20 min) el agua de ensayo o añadiendo un tóxico (por ejemplo, azida de sodio (NaN_3) a la concentración de 10-20 g/l, cloruro mercúrico ($HgCl_2$) a la de 100 mg/l o formol a la de 100 mg/l) o con rayos gamma. Si se utiliza $HgCl_2$, debe eliminarse luego como residuo tóxico. Si se han añadido al agua grandes cantidades de sedimento, no es fácil conseguir condiciones estériles; en tal caso, se recomienda repetir el tratamiento en autoclave (por ejemplo, tres veces). Debe tenerse en cuenta que el tratamiento en autoclave puede alterar las características de adsorción del sedimento,

— controles de disolventes, con agua de ensayo más sustancia de referencia y con agua de ensayo sin esta sustancia; matraces duplicados con la misma cantidad de disolvente y sometidos al mismo procedimiento que para la aplicación de la sustancia problema. Lo que se pretende es examinar los posibles efectos adversos del disolvente determinando la degradación de la sustancia de referencia.

Al diseñar el ensayo, el investigador ha de considerar la importancia relativa del aumento de la replicación experimental frente al aumento del número de tiempos de muestreo. El número exacto de matraces necesarios depende del método utilizado para medir la degradación (véase el párrafo tercero del punto 1.8.9.1, el punto 1.8.9.4 y el apéndice 3).

▼**M1**

A cada tiempo de muestreo se toman dos submuestras (por ejemplo, alícuotas de 5 ml) de cada matraz de ensayo. Si se utilizan varios matraces para permitir recoger matraces enteros, debe tomarse un mínimo de dos matraces a cada tiempo de muestreo (véase el párrafo primero del punto 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparación de matraces para el ensayo con sedimento en suspensión (opcional)*

Se añaden a los recipientes de ensayo los volúmenes necesarios de agua de ensayo y sedimento, en su caso (véase el punto 1.8.5). La preparación de los matraces para el ensayo con sedimento en suspensión es igual que para el ensayo pelágico (véanse los puntos 1.8.9.1 y 1.8.9.2). Es mejor utilizar botellas de suero o matraces de forma similar. Los matraces cerrados se colocan horizontalmente en un agitador. Evidentemente, los matraces abiertos con sustancias no volátiles y no marcadas con ^{14}C deben colocarse de pie; en tal caso se recomienda la agitación magnética con varillas magnéticas recubiertas de cristal. Cuando sea necesario habrá que airear las botellas para mantener unas condiciones aerobias adecuadas.

1.8.9.4. *Determinaciones radioquímicas*

La cantidad de $^{14}CO_2$ producida se mide directa e indirectamente (véase el apéndice 3). La cantidad de $^{14}CO_2$ se determina indirectamente por la diferencia entre la actividad inicial de ^{14}C en el agua o suspensión de ensayo y la actividad total residual al tiempo del muestreo medida tras acidificar la muestra hasta un pH de 2-3 y eliminar el CO_2. El carbono inorgánico queda así eliminado y la actividad residual medida corresponderá al material orgánico. No debe efectuarse la determinación indirecta del $^{14}CO_2$ si de la transformación de la sustancia problema se forman productos volátiles principalmente (véase el apéndice 3). A ser posible, la evolución del $^{14}CO_2$ debe medirse directamente (véase el apéndice 3) a cada tiempo de muestreo en al menos un matraz de ensayo; este procedimiento permite que se comprueben tanto el balance de masa como el proceso de biodegradación, pero está limitado a los ensayos efectuados con recipientes cerrados.

Si el $^{14}CO_2$ formado se mide directamente durante el ensayo, deben reservarse más matraces a este efecto al inicio del ensayo. Se recomienda la determinación directa del $^{14}CO_2$ si de la transformación de la sustancia problema se forman productos volátiles importantes. A cada tiempo de medición, los matraces de ensayo adicionales se acidifican hasta obtener un pH de 2-3 y el $^{14}CO_2$ se recoge en un absorbente interno o externo (véase el apéndice 3).

Se puede optar por determinar las concentraciones de sustancias problema y productos de transformación mayoritarios marcados con ^{14}C, mediante radiocromatografía (por ejemplo, cromatografía de capa fina, RAD-TLC) o HPLC con detección radioquímica.

También se puede determinar la distribución en fases de la radiactividad restante (véase el apéndice 1), así como la sustancia problema residual y los productos de transformación.

▼**M1**

Al final del ensayo ha de determinarse el balance de masa mediante medición directa del $^{14}CO_2$ utilizando matraces de ensayo aparte, de los que no se haya tomado ninguna muestra durante el desarrollo del ensayo (véase el apéndice 3).

1.8.9.5. *Análisis químico específico*

Si se dispone de un método de análisis específico y sensible, la biodegradación primaria puede evaluarse midiendo la concentración residual total de sustancia problema en lugar de aplicar técnicas de radiomarcado. Si se utiliza una sustancia problema radiomarcada (para medir la mineralización total), pueden hacerse en paralelo análisis químicos específicos para conseguir información adicional útil y comprobar el procedimiento. Los análisis químicos específicos también pueden utilizarse para medir los productos de transformación formados durante la degradación de la sustancia problema, lo que se recomienda en caso de sustancias cuya vida media de mineralización sea superior a 60 días. Se mide y se registra la concentración de la sustancia problema y de los productos de transformación en cada tiempo de muestreo (como concentración y como porcentaje de la sustancia aplicada). En general, deben identificarse los productos de transformación detectados en cualquier tiempo de muestreo, a concentraciones ≥ 10 % de la concentración aplicada, salvo que se justifique otra opción. Habrá de tomarse también en consideración la identificación de los productos de transformación cuyas concentraciones aumenten continuamente durante el estudio, aunque tales concentraciones no superen los límites indicados anteriormente, ya que este aumento puede indicar persistencia. Debe considerarse la realización de análisis de los productos de transformación en los controles estériles si se piensa que es posible una transformación abiótica rápida de la sustancia problema (por ejemplo, hidrólisis). Debe sopesarse en cada caso la necesidad de cuantificar e identificar los productos de transformación, indicando en el informe las justificaciones pertinentes. Las técnicas de extracción con disolventes orgánicos deben aplicarse según las instrucciones del procedimiento analítico correspondiente.

Todas las muestras se conservarán a una temperatura de 2 a 4 °C en recipientes herméticos al aire si el análisis se realiza en el plazo de 24 horas (método preferible). Para una conservación más prolongada, las muestras deben congelarse por debajo de –18 °C o tratarse químicamente. No se recomienda la acidificación para conservar las muestras, ya que las muestras acidificadas pueden ser inestables. Si las muestras no se analizan en el plazo de 24 horas y se conservan durante más tiempo, debe efectuarse un estudio de la estabilidad ante la conservación a fin de demostrar la estabilidad de las sustancias de interés cuando se congelan por debajo de –18 °C o se conservan químicamente. Si el método analítico implica la extracción bien con disolventes o bien en fase sólida, la extracción se efectuará inmediatamente tras el muestreo o tras conservar la muestra refrigerada durante un máximo de 24 horas.

En función de la sensibilidad del método analítico, puede ser necesario disponer de volúmenes de muestra mayores que los indicados en el punto 1.8.1. El ensayo puede realizarse fácilmente con volúmenes de ensayo de un litro en matraces de 2-3 litros, lo que permite recoger muestras de unos 100 ml.

▼M1

2. **DATOS E INFORME**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

2.1.1. **Representación gráfica de los datos**

Los tiempos de muestreo se redondean a horas enteras (salvo si la sustancia se degrada significativamente en cuestión de minutos u horas) pero no a días enteros. Se representan frente al tiempo las estimaciones de la actividad residual de la sustancia problema (en caso de sustancias marcadas con ^{14}C) o de la concentración residual (en caso de sustancias no marcadas), tanto de forma lineal como semilogarítmica (véanse las figuras 1a y 1b). Si ha habido degradación, se comparan los resultados de los matraces F_T con los de los matraces F_S. Si las medias de los resultados de los matraces con sustancia problema (F_T) y los matraces estériles (F_S) se desvían en menos del 10 %, puede aceptarse que la degradación observada es predominantemente abiótica. Si la degradación en los matraces F_S es menor, las cifras pueden utilizarse para corregir las obtenidas con los matraces F_T (por sustracción) a fin de estimar la amplitud de la biodegradación. Cuando se efectúan análisis opcionales de productos de transformación mayoritarios, deben hacerse gráficas de su formación y desaparición, además de la gráfica de desaparición de la sustancia problema.

La duración del tiempo de latencia t_L se estima a partir de la curva de degradación (representación semilogarítmica) extrapolando su parte lineal a la degradación nula, o bien determinando el tiempo correspondiente a una degradación aproximada del 10 % (véanse las figuras 1a y 1b). A partir de la representación semilogarítmica se estiman la constante de velocidad de primer orden, k, y su error estándar mediante regresión lineal de la gráfica ln (actividad residual de ^{14}C o concentración de sustancia problema) frente al tiempo. Con las mediciones de ^{14}C en particular, debe recurrirse solo a datos pertenecientes a la parte lineal inicial de la curva tras el final del tiempo de latencia, y darse preferencia a la selección de unos pocos datos representativos, en vez de a un número mayor de datos más inciertos. La incertidumbre incluye aquí errores inherentes al uso directo recomendado de mediciones de la actividad residual de ^{14}C (véase más abajo). A veces puede ser pertinente calcular dos constantes de velocidad diferentes, si la degradación sigue un modelo bifásico. Con este objeto se definen dos fases diferentes de la curva de degradación. Deben calcularse la constante de velocidad, k, y la vida media, $t_{½} = \ln 2/k$, correspondientes a cada uno de los matraces replicados si se toman submuestras del mismo matraz, o utilizando los valores medios si se toman matraces enteros a cada tiempo de muestreo (véase el último párrafo del punto 1.8.9.2). Cuando se utilice el procedimiento mencionado en primer lugar, deben indicarse la constante de velocidad y la vida media correspondientes a cada uno de los distintos matraces replicados, así como un valor medio con su error estándar. Si se han utilizado concentraciones elevadas de sustancia problema, la curva de degradación puede desviarse considerablemente de una recta (representación semilogarítmica), con lo que no sería válida la cinética de primer orden. Por tanto, no tendría sentido definir una vida media. Sin embargo, con un intervalo limitado de datos, puede aplicarse una cinética de pseudo-primer orden y estimarse el semiperíodo de degradación, DT_{50} (tiempo trascurrido hasta alcanzar una degradación del 50 %). No obstante, ha de recordarse que la evolución temporal de la degradación más allá del intervalo seleccionado de datos no puede predecirse utilizando el DT_{50}, que es simplemente un descriptor de un conjunto determinado de datos. Se dispone de herramientas analíticas para facilitar los cálculos estadísticos y el ajuste de la curva, y se recomienda el uso de este tipo de programas informáticos.

▼M1

Si se realizan análisis químicos específicos, se estiman las constantes de velocidad y las vidas medias de la degradación primaria de la misma forma que se indicaba antes para la mineralización total. Si la degradación primaria es el proceso limitante, a veces es posible utilizar puntos de datos de todo el proceso de degradación. Esto es así porque las mediciones son directas, a diferencia de las mediciones de la actividad de ^{14}C.

Si se utilizan sustancias marcadas con ^{14}C, hay que expresar un balance de masas en porcentaje de la concentración inicial aplicada, al menos al final del ensayo.

2.1.2. **Actividad residual**

Cuando se biodegrada la parte marcada con ^{14}C de una sustancia orgánica, la mayor parte del ^{14}C se convierte en $^{14}CO_2$, mientras que otra parte se destina al crecimiento de la biomasa o a la síntesis de metabolitos extracelulares. Por tanto, la biodegradación «final» completa de una sustancia no produce la conversión del 100 % de su carbono en $^{14}CO_2$. El ^{14}C integrado en productos formados por biosíntesis se libera después lentamente como $^{14}CO_2$, debido a una «mineralización secundaria». Por este motivo, la representación gráfica de la actividad de ^{14}C orgánico residual (medida tras la eliminación del CO_2) o del $^{14}CO_2$ producido frente al tiempo mostrará una «cola» después de que haya terminado la degradación. Esto complica la interpretación cinética de los datos, y, con este propósito, solo debe utilizarse normalmente la parte inicial de la curva (después de que haya terminado el tiempo de latencia y antes de que se alcance aproximadamente el 50 % de degradación) para la estimación de la constante de velocidad de degradación. Si se degrada la sustancia problema, la actividad residual total de ^{14}C orgánico siempre será mayor que la actividad de ^{14}C relacionada con la sustancia problema que quede intacta. Si la sustancia problema se degrada según una reacción de primer orden y una fracción constante α se mineraliza pasando a CO_2, la pendiente inicial de la curva de desaparición del ^{14}C (^{14}C orgánico total frente al tiempo) será el resultado de multiplicar por α la pendiente de la curva correspondiente a la concentración de la sustancia problema (o, para mayor precisión, de la parte de la sustancia problema marcada con ^{14}C). Al utilizarse mediciones de la actividad total de ^{14}C orgánico sin corregir, la constante de velocidad de degradación calculada será, por tanto, de tipo conservador. En la bibliografía (2) (9) (10) (11) se describen procedimientos para estimar las concentraciones de la sustancia problema a partir de las actividades radioquímicas medidas, aplicando distintas hipótesis simplificadoras. Tales procedimientos son sobre todo aplicables a las sustancias rápidamente degradables.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si se ve que k es independiente de la concentración añadida (es decir, si la k calculada es aproximadamente igual a las distintas concentraciones de la sustancia problema), puede aceptarse que la constante de velocidad de primer orden es representativa de las condiciones de ensayo aplicadas: la sustancia problema, la muestra de agua y la temperatura de ensayo. Un juicio experto debe evaluar en qué medida los resultados pueden generalizarse o extrapolarse a otros sistemas. Si se utiliza una elevada concentración de sustancia problema, y por tanto la degradación no sigue una cinética de primer orden, los datos no podrán utilizarse para la estimación directa de una constante de velocidad de primer orden o una vida media correspondiente. Sin embargo, los datos procedentes de un ensayo en el que se utilice una elevada concentración de sustancia problema podrán ser útiles al menos para estimar el grado de mineralización total o para detectar y cuantificar los productos de transformación.

▼M1

Si se conocen las velocidades de otros procesos de pérdida distintos de la biodegradación (por ejemplo, hidrólisis o volatilización), podrán sustraerse de la velocidad de pérdida neta observada durante el ensayo para dar una estimación aproximada de la velocidad de biodegradación. Por ejemplo, pueden obtenerse datos sobre la hidrólisis con los controles estériles o con ensayos paralelos en los que se utilicen concentraciones superiores de la sustancia problema.

La determinación indirecta y directa del $^{14}CO_2$ (punto 1.8.9.4 y apéndice 3) solo puede utilizarse para medir el alcance de la mineralización de la sustancia problema hasta convertirse en CO_2. La radiocromatografía (RAD-TLC) o la HPLC pueden utilizarse para analizar las concentraciones de las sustancias problema marcadas con ^{14}C y la formación de los productos de transformación mayoritarios (párrafo tercero del punto 1.8.9.4). Para que se pueda efectuar una estimación directa de la vida media, es necesaria la ausencia de productos de transformación mayoritarios (definidos como aquellos que representan individualmente una concentración ≥ 10 % de la cantidad aplicada de sustancia problema). En caso de presencia de productos de transformación mayoritarios, según se acaban de definir, es necesario proceder a una evaluación detallada de los datos. Aquí puede incluirse la repetición del ensayo o la identificación de los productos de transformación (véase el párrafo primero del punto 1.8.9.5) salvo que el destino de los productos de transformación pueda evaluarse razonablemente según la experiencia (por ejemplo, con información sobre la ruta de degradación). Como varía la proporción de carbono de la sustancia problema que se ha convertido en CO_2 (dependiendo en gran medida de la concentración de sustancia problema y de otros sustratos disponibles, de las condiciones del ensayo y de la comunidad microbiana), este ensayo no permite una estimación directa de la biodegradación final como en un ensayo de desaparición del COD, pero el resultado es similar al obtenido con un ensayo respirométrico. El grado de mineralización será así más o menos igual al nivel mínimo de biodegradación final. Para obtener una imagen más completa de la biodegradación final (mineralización e incorporación a la biomasa), debe realizarse al final del ensayo el análisis de la distribución en fases del ^{14}C (véase el apéndice 1). El ^{14}C presente en el conjunto de partículas consistirá en el ^{14}C incorporado a la biomasa bacteriana y en el ^{14}C adsorbido a partículas orgánicas.

2.3. VALIDEZ DEL ENSAYO

Si la sustancia de referencia no se degrada dentro del intervalo de tiempo previsto (en el caso de la anilina y del benzoato de sodio, normalmente menos de dos semanas), la validez del ensayo queda bajo sospecha y debe comprobarse posteriormente, o bien ha de repetirse el ensayo con otra muestra de agua. En un ensayo de intercalibración del método, organizado por la ISO y en el que participaron siete laboratorios situados en distintos puntos de Europa, las constantes de velocidad de degradación adaptadas de la anilina variaron entre 0,3 y 1,7 días^{-1} con una media de 0,8 d^{-1} a 20 °C y un error estándar de ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 días). Los tiempos de latencia típicos estaban entre 1 y 7 días. Se informó de que las aguas examinadas tenían una biomasa bacteriana correspondiente a 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colonias por ml. Las velocidades de degradación en las aguas ricas en nutrientes de Europa central eran mayores que en las aguas oligotróficas de los países nórdicos, lo que puede deberse a la diferente situación trófica o a alguna exposición previa a las sustancias.

La recuperación total (balance de masas) al final de experimento debe situarse entre el 90 y el 110 % en caso de sustancias radiomarcadas, mientras que la recuperación inicial al principio del experimento debe estar entre el 70 y el 110 % en caso de sustancias no marcadas. Sin embargo, estos intervalos deben interpretarse solo como objetivos y no utilizarse como criterios de aceptación del ensayo.

▼M1

3. **INFORME DEL ENSAYO**

El tipo de estudio, es decir, si es pelágico o con sedimento en suspensión, debe figurar claramente en el informe del ensayo, que también incluirá como mínimo la información siguiente:

Sustancias problema y de referencia:

— denominaciones comunes, nombres químicos (recomendados por la IUPAC o nombres CAS), números CAS, fórmulas estructurales (con indicación de la posición del ^{14}C si se utilizan sustancias radiomarcadas) y propiedades fisicoquímicas pertinentes de las sustancias problema y de referencia (véanse los puntos 1.5 y 1.6),

— nombres químicos, números CAS, fórmulas estructurales (con indicación de la posición del ^{14}C si se utilizan sustancias radiomarcadas) y propiedades fisicoquímicas pertinentes de las sustancias utilizadas como patrones para la identificación y cuantificación de los productos de transformación,

— pureza (impurezas) de las sustancias problema y de referencia,

— pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad específica (si procede).

Aguas superficiales:

Debe aportarse como mínimo la siguiente información sobre la muestra de agua tomada:

— ubicación y descripción del lugar de muestreo, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación,

— fecha y hora de la toma de muestras,

— nutrientes (N total, amonio, nitritos, nitratos, P total, ortofosfato disuelto),

— profundidad a la que se ha tomado la muestra,

— aspecto de la muestra (por ejemplo, color y turbidez),

— COD y COT,

— DBO,

— temperatura y pH en el lugar y a la hora de la recogida,

— potencial de oxígeno o redox (obligatorio si no es evidente el carácter aerobio de las condiciones),

— salinidad o conductividad (en caso de agua salina o salobre),

— sólidos en suspensión (en caso de muestra turbia),

— otra información que pueda ser de interés sobre el lugar de muestreo en el momento del mismo (por ejemplo, datos históricos o actuales sobre el caudal del río o corriente marítima, proximidad a vertidos importantes y tipo de vertidos, condiciones meteorológicas antes del momento del muestreo),

y, opcionalmente,

— biomasa microbiana (por ejemplo, recuento directo con naranja de acridina o unidades formadoras de colonias),

▼M1

— carbono inorgánico,

— concentración de clorofila a como estimación específica de la biomasa de algas.

Por otra parte, debe proporcionarse la información siguiente sobre el sedimento cuando se realice un ensayo con sedimento en suspensión:

— profundidad a la que se ha tomado el sedimento,

— aspecto del sedimento (por ejemplo, coloreado, fangoso, limoso o arenoso),

— textura (por ejemplo, porcentaje de arena gruesa, arena fina, limo y arcilla),

— peso seco en g/l de los sólidos en suspensión, concentración de COT o pérdida de peso por calcinación como medida del contenido de materia orgánica,

— pH,

— potencial de oxígeno o redox (obligatorio si no es evidente el carácter aerobio de las condiciones).

Condiciones de ensayo:

— tiempo transcurrido entre la recogida y la utilización en el ensayo de laboratorio, conservación y tratamiento previo de la muestra, fechas de realización de los estudios,

— cantidad de sustancia problema aplicada, concentración de ensayo y sustancia de referencia,

— método de aplicación de la sustancia problema, incluido el eventual uso de disolventes,

— volumen de agua superficial utilizada y de sedimento (en su caso), y volumen de las muestras tomadas para su análisis en cada intervalo,

— descripción del sistema de ensayo utilizado.

Si no debe mantenerse la oscuridad, información sobre las condiciones de «luz difusa»;

— información sobre los métodos utilizados para establecer los controles de esterilidad (por ejemplo, temperatura, tiempo y número de tratamientos en autoclave),

— temperatura de incubación,

— información sobre técnicas analíticas y métodos utilizados para mediciones radioquímicas y supervisión del balance de masas, así como mediciones de la distribución en fases (en su caso),

— número de réplicas.

Resultados:

— porcentajes de recuperación (véase el punto 1.7.1),

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos de análisis utilizados, incluido el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOC) (véase el punto 1.7.2),

▼M1

— todos los datos medidos (incluidos los tiempos de muestreo) y los valores calculados en forma tabular, así como las curvas de degradación; respecto a cada concentración de ensayo y cada uno de los matraces replicados, debe indicarse el coeficiente de correlación lineal de la pendiente de la representación logarítmica, el tiempo de latencia estimado y la constante de velocidad de primer o de pseudoprimer orden (a ser posible), así como la vida media de degradación correspondiente (o el período de vida media, t_{50}),

— valores importantes como medias de los resultados observados en las distintas réplicas, por ejemplo, la duración del tiempo de latencia, la constante de velocidad de degradación y la vida media de degradación (o el t_{50}),

— categorización del sistema como adaptado o no adaptado, según el aspecto de la curva de degradación y la posible influencia de la concentración de ensayo,

— resultados de la supervisión del balance de masa final y resultados de las mediciones de la distribución en fases (en su caso),

— fracción de ^{14}C mineralizado y, si se hacen análisis específicos, nivel final de la degradación primaria,

— identificación, concentración molar y porcentaje de los productos aplicados y de los de transformación mayoritarios (véase el párrafo primero del punto 1.8.9.5), cuando proceda,

— vía de transformación propuesta, si procede,

— discusión de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OECD TG 309 (2004). Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

(2) ISO/DIS 14592-1 (1999). Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

(3) Método de ensayo C.23. Transformación aerobia y anaerobia en el suelo.

(4) Método de ensayo C.24. Transformación aerobia y anaerobia en sistemas de sedimentos acuáticos.

(5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, París.

(6) ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

(7) ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(8) OECD (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 22.

▼**M1**

(9) Simkins, S., y Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol. 47, 394-401.

(10) Ingerslev, F., y N. Nyholm (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

(11) ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — Report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Apéndice 1

Distribución en fases del ^{14}C

Para supervisar el procedimiento, las mediciones normales de la actividad de ^{14}C orgánico total residual (AOT) deben complementarse con mediciones del balance de masa mediante determinación directa del $^{14}CO_2$ formado previa retención en un absorbente (véase el apéndice 3). El mero hecho de que se forme $^{14}CO_2$ es en sí una prueba directa de biodegradación, frente a la degradación abiótica u otros mecanismos de pérdida, como la volatilización y la adsorción. Es posible obtener información adicional útil sobre las características de biodegradabilidad a partir de mediciones de la distribución de la AOT entre el estado disuelto (actividad de ^{14}C orgánico disuelto, AOD) y en partículas (actividad de ^{14}C orgánico en partículas, AOP) previa separación de las partículas mediante filtración por membrana o centrifugación. La AOP se refiere a la sustancia problema adsorbida en la biomasa microbiana o en otras partículas, además del carbono de la sustancia problema que se haya utilizado en la síntesis de nuevo material celular y, por tanto, se haya incorporado a la fracción particulada de la biomasa. La formación de material orgánico con ^{14}C disuelto puede estimarse como la AOD al final de la biodegradación (meseta en la curva degradación-tiempo).

La distribución en fases del ^{14}C residual en muestras elegidas se estima pasando las muestras por un filtro de membrana de 0,22 μm o 0,45 μm, procurando que el filtro sea de un material que no adsorba cantidades significativas de sustancia problema (pueden ser adecuados los filtros de policarbonato). Si la sorción de sustancia problema en el filtro es demasiado importante como para despreciarla (este extremo se ha de comprobar antes de que se efectúe el experimento), puede sustituirse la filtración por centrifugación a elevada velocidad (2 000 g; 10 min).

El filtrado o centrifugado se trata como se describe en el apéndice 3 respecto a las muestras sin filtrar. Los filtros de membrana se disuelven en un líquido de centelleo adecuado y se hace el recuento normalmente, en principio utilizando solo el método de la proporción con el patrón externo para corregir la atenuación, o bien se utiliza un oxidante de la muestra. Si se ha recurrido a la centrifugación, el precipitado de las partículas se vuelve a suspender en 1-2 ml de agua destilada y se pasa a un frasco de centelleo. Después se lava dos veces con 1 ml de agua destilada y el agua utilizada se pasa al frasco. En caso necesario, la suspensión puede incorporarse a un gel para recuento de centelleo líquido.

▼M1

Apéndice 2

Procedimiento semicontinuo

Puede ser necesario prolongar la incubación hasta varios meses para conseguir una degradación suficiente de sustancias persistentes. La duración del ensayo no debe pasar en principio de 60 días, salvo que se mantengan las características de la muestra original de agua mediante la renovación de la suspensión de ensayo. Sin embargo, si en los primeros 60 días se ha iniciado la degradación de la sustancia problema, la duración del ensayo puede ampliarse hasta un máximo de 90 días sin renovación de la suspensión de ensayo.

Si la incubación dura mucho tiempo, la diversidad de la comunidad microbiana puede verse reducida por diversos mecanismos de pérdida y por el posible agotamiento de nutrientes esenciales y sustratos primarios de carbono en la muestra de agua. Por tanto, se recomienda efectuar un ensayo semicontinuo para determinar adecuadamente la velocidad de degradación de las sustancias que se degradan lentamente. El ensayo debe iniciarse con un procedimiento semicontinuo si, en función de la experiencia previa, se espera que sea necesario un período de incubación de tres meses para lograr una degradación del 20 % de la sustancia. Otra posibilidad es pasar el ensayo discontinuo normal a ensayo semicontinuo si al cabo de unos 60 días de seguir el procedimiento discontinuo no se aprecia ninguna degradación de la sustancia problema. Puede pararse el procedimiento semicontinuo y seguir el experimento como experimento discontinuo cuando se haya registrado una degradación sustancial (por ejemplo, > 20 %).

En el ensayo semicontinuo, cada dos semanas se sustituye un tercio aproximadamente del volumen de la suspensión de ensayo por agua recién recogida con la sustancia problema añadida a la concentración inicial. Análogamente, si se efectúa el ensayo opcional con sedimento en suspensión, al agua de sustitución se le añade sedimento a la concentración inicial (entre 0,01 y 1 g/l). Cuando se realiza el ensayo con sedimento sólido en suspensión, es importante que se mantenga el sistema totalmente en suspensión también durante la renovación del agua, y que el tiempo de residencia sea el mismo para los sólidos y para el agua, ya que en caso contrario podría perderse la deseada similitud con un sistema acuoso homogéneo sin fases fijas. Por estos motivos, se prefiere que, cuando se utilice un procedimiento semicontinuo, la concentración inicial de sedimentos en suspensión se sitúe en la banda baja del intervalo especificado.

La adición prescrita de sustancia problema implica que la concentración inicial de sustancia problema no se vea superada por la renovación parcial de la suspensión de ensayo y, por tanto, se evite la adaptación que se encuentra frecuentemente con concentraciones elevadas de sustancia problema. Como el procedimiento incluye tanto una reinoculación como una compensación de los nutrientes y sustratos primarios agotados, se restablece la diversidad microbiana original y la duración del ensayo puede prolongarse, en principio indefinidamente. Cuando se utiliza el procedimiento semicontinuo, es importante observar que la concentración residual de la sustancia problema debe corregirse para tener en cuenta las cantidades de sustancia problema añadidas y eliminadas en cada operación de renovación. Si el compuesto se adsorbe, las concentraciones de sustancia problema total y disuelta serán intercambiables. La sorción es despreciable (< 5 %) en las condiciones especificadas (0,1 a 1 g sólidos/l) en caso de sustancias de log K_{ow} < 3 (válido para compuestos neutros y lipófilos). Esto queda ilustrado con el siguiente ejemplo de cálculo. 0,1 g/l de sólidos corresponden aproximadamente a 10 mg de carbono por litro (fracción de carbono, f_C = 0,01). Si se acepta que:

log K_{ow} (de la sustancia problema) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

coeficiente de reparto, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

entonces, la fracción disuelta de la concentración total [C-agua (C_w)/C-total (C_t)] es:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Apéndice 3

Determinación del $^{14}CO_2$

Determinación indirecta del $^{14}CO_2$

Para las mediciones normales, el método indirecto suele ser el que menos tiempo exige y el más preciso, si la sustancia problema no es volátil ni se transforma en productos volátiles. Se transfieren simplemente muestras sin filtrar de, por ejemplo, 5 ml a frascos de centelleo. Es adecuada una actividad inicial en las muestras de 5 000 dpm a 10 000 dpm (80 a 170 Bq), y la actividad inicial mínima es de unas 1 000 dpm. El CO_2 debe eliminarse tras acidificar hasta un pH de 2-3 con 1 a 2 gotas de H_3PO_4 o HCl concentrado. La eliminación del CO_2 puede efectuarse burbujeando aire durante aproximadamente 30 min o 1 hora. Otra posibilidad consiste en agitar enérgicamente los frascos durante 1 a 2 horas (por ejemplo, en un agitador de microplacas), o bien agitarlos más suavemente hasta el día siguiente. Debe comprobarse la eficacia del procedimiento de eliminación del CO_2, prolongando el período de aireación o de agitación. A continuación se añade un líquido de centelleo adecuado para el recuento de muestras acuosas, se homogeneiza la muestra con un mezclador de torbellino y se determina la radiactividad mediante recuento de centelleo líquido, restando la actividad de fondo observada en los ensayos en blanco (F_B). Salvo que el agua de ensayo sea muy coloreada o contenga una elevada concentración de partículas, las muestras exhibirán normalmente una atenuación uniforme y será suficiente efectuar una corrección de la atenuación utilizando un patrón externo. Si el agua de ensayo está muy coloreada, puede ser necesario corregir la atenuación mediante la adición de un patrón interno. Si la concentración de partículas es elevada, puede que no sea viable obtener una solución o un gel homogéneos, o que la variación de la atenuación entre las muestras sea grande. En tal caso, podrá utilizarse el método de recuento descrito más abajo para el ensayo de lodos. Si el ensayo se realiza como ensayo de sedimento en suspensión, la medición del $^{14}CO_2$ podría hacerse indirectamente tomando una muestra homogénea de 10 ml de la suspensión o agua de ensayo y separando las fases mediante centrifugación a una velocidad adecuada (por ejemplo, a 40 000 m/s^2 durante 15 min). La fase acuosa se trataría a continuación como se describe más arriba. La actividad de ^{14}C en la fase particulada (AOP) debe determinarse volviendo a suspender el sedimento en un pequeño volumen de agua destilada, transfiriendo esta suspensión a frascos de centelleo y añadiendo líquido de centelleo para formar un gel (se encuentran líquidos de centelleo especiales para este fin). Según la naturaleza de las partículas (por ejemplo, su contenido en materia orgánica), puede ser factible digerir la muestra hasta el día siguiente con un solubilizador de tejidos y homogeneizar después con un mezclador de torbellino antes de añadirle líquido de centelleo. Otra posibilidad consiste en determinar la AOP mediante combustión en exceso de oxígeno utilizando un oxidante de la muestra. Para hacer el recuento, deben incluirse siempre patrones internos, y puede ser necesario efectuar correcciones de la atenuación añadiendo patrones internos a cada una de las muestras.

Determinación directa del $^{14}CO_2$

Si se mide directamente el $^{14}CO_2$ formado, debe hacerse poniendo más matraces al inicio del ensayo; los matraces de ensayo se recogen a cada tiempo de medición, se acidifican hasta un pH de 2-3 y se recoge el $^{14}CO_2$ con un absorbente interno (colocado en cada matraz al principio del ensayo) o externo. Como medio absorbente puede utilizarse un álcali (por ejemplo, solución de NaOH 1 N, o una lenteja de NaOH), etanolamina o un absorbente a base de etanolamina, o algún absorbente disponible en el comercio. Si se recurre a la medición directa del $^{14}CO_2$, los matraces deben estar cerrados con, por ejemplo, diafragmas de caucho butílico.

▼**M1**

Figura 1a

Ejemplo de representación aritmética de los datos (actividad residual frente al tiempo)

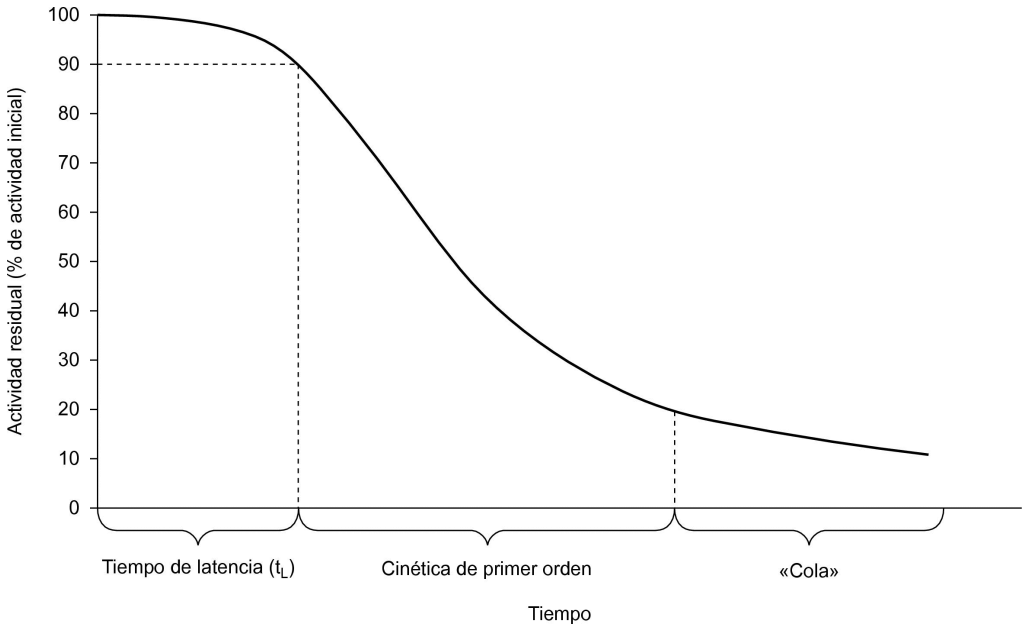
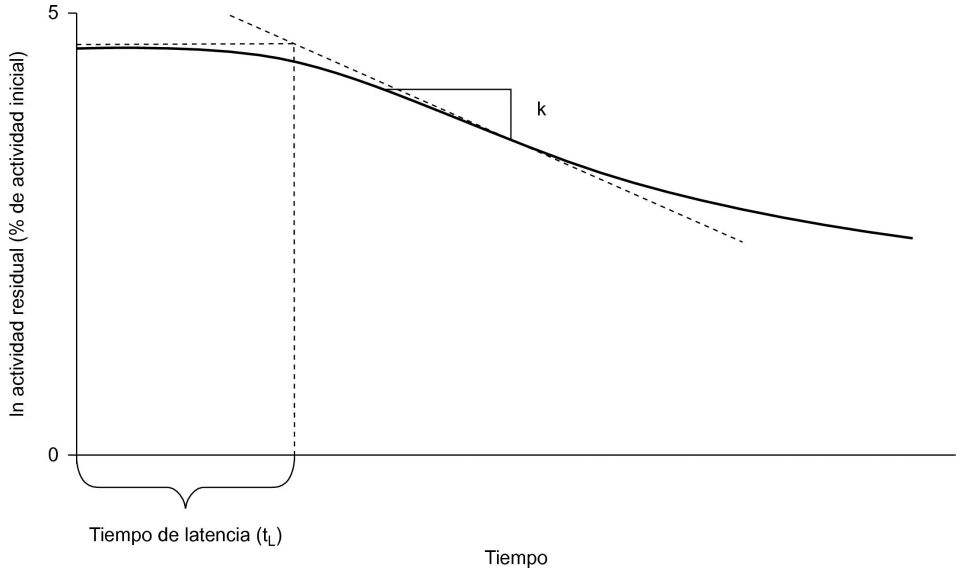


Figura 1b

Ejemplo de representación semilogarítmica de los datos (ln de la actividad residual frente al tiempo)



▼M1

C.26. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *LEMNA* SPP.

1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 221 (2006) (1). Se ha llegado a un amplio acuerdo entre las autoridades de la UE en el sentido de que el ensayo con *Lemna* consituye una alternativa adecuada a un ensayo con algas en caso de sustancias fuertemente coloreadas (2) (3).

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente método de ensayo es evaluar la toxicidad de las sustancias para las plantas de agua dulce del género *Lemna* (lenteja de agua). Se basa en directrices anteriores (4) (5) (6) (7) (8) (9), pero incluye modificaciones encaminadas a tener en cuenta los resultados de recientes investigaciones y consultas sobre diversos aspectos fundamentales. El método propuesto se ha validado mediante un ensayo de intercalibración internacional (10).

El presente método describe el ensayo de toxicidad con *Lemna gibba* y *Lemna minor*, dos especies que han sido estudiadas ampliamente y son objeto de las normas arriba citadas. La taxonomía de *Lemna* spp. es difícil y se ve complicada por la existencia de una amplia gama de fenotipos. Aunque puede aparecer variabilidad genética en la respuesta de *Lemna* a los agentes tóxicos, actualmente no se tienen datos suficientes sobre esta fuente de variabilidad como para recomendar el uso de un clon determinado en el presente método. Ha de señalarse que el ensayo no se realiza en condiciones axénicas, pero se toman medidas en distintas fases del ensayo para reducir al mínimo la contaminación por otros organismos.

Se incluyen pormenores sobre los ensayos con renovación (semiestáticos y dinámicos) y sin renovación (estáticos) de la solución de ensayo. En función de los objetivos del ensayo y de las imposiciones normativas, se recomienda considerar la aplicación de métodos semiestáticos y dinámicos, por ejemplo en caso de sustancias que desparezcan rápidamente de la solución por volatilización, fotodegradación, precipitación o biodegradación. En la referencia (11) se dan más orientaciones.

1.2. DEFINICIONES

En relación con el presente método de ensayo se entenderá por:

Biomasa: el peso seco de materia viva presente en una población. En este ensayo, lo que se mide normalmente son indicadores de la biomasa, como el número de frondas o la superficie de las frondas, por lo que el término de «biomasa» se refiere también a estos indicadores.

Clorosis: el amarilleamiento del tejido de la fronda.

Clon: el conjunto de organismos o células procedentes de un solo individuo por reproducción asexual. Los individuos del mismo clon son, por tanto, genéticamente idénticos.

Colonia: el conjunto de frondas madre e hijas (generalmente de 2 a 4) unidas entre sí. A veces se le da el nombre de planta.

▼M1

EC_x: la concentración de la sustancia problema disuelta en el medio de ensayo que produce una reducción del x % (por ejemplo, del 50 %) en el crecimiento de *Lemna* dentro de un plazo de exposición definido (que debe indicarse explícitamente si es distinto de la duración completa o normal del ensayo). Para expresar de forma inequívoca el valor de EC obtenido a partir de la tasa de crecimiento o del rendimiento, se usan respectivamente los símbolos «EC_t» y «EC_r», seguidos de la variable de medición que se ha utilizado, por ejemplo EC_t (número de frondas).

Ensayo dinámico: el ensayo en que las soluciones de ensayo se renuevan continuamente.

Fronda: cada una de las estructuras «foliáceas» simples de una planta de lenteja de agua. Es la unidad mínima, es decir, individuo, capaz de reproducirse.

Deformación: la presencia de frondas con protuberancias o aspecto hinchado.

Crecimiento: el aumento de la variable de medición, por ejemplo el número de frondas, el peso seco, el peso húmedo o la superficie de las frondas, a lo largo de la duración del ensayo.

Tasa de crecimiento (tasa media de crecimiento específico): el aumento logarítmico de la biomasa durante el período de exposición.

Concentración mínima con efecto observado (LOEC): la concentración estudiada mínima a la que se observa que la sustancia ejerce un efecto estadísticamente significativo de reducción del crecimiento (con $p < 0,05$) cuando se compara con el control, dentro de un tiempo de exposición dado. Sin embargo, es necesario también que todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC ejerzan un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

Variables de medición: las variables de cualquier tipo que se miden para expresar el criterio del ensayo utilizando una o más variables de respuesta diferentes. En este método se consideran variables de medición el número de frondas, la superficie de las frondas, el peso fresco y el peso seco.

Monocultivo: el cultivo con una sola especie vegetal.

Necrosis: el tejido de fronda muerto (es decir, blanco o saturado de agua).

Concentración sin efecto observado (NOEC): la concentración estudiada que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

Fenotipo: las características observables de un organismo determinadas por la interacción de sus genes con su entorno.

Variables de respuesta: las variables para la estimación de la toxicidad derivadas de cualquier variable de medición que describa la biomasa por distintos métodos de cálculo. A efectos del presente método, las tasas de crecimiento y el rendimiento son variables de respuesta derivadas de variables de medición como el número de frondas, la superficie de las frondas, el peso fresco y el peso seco.

Ensayo semiestático (de renovación): el ensayo en que, a lo largo de su duración, la solución de ensayo se sustituye periódicamente, a intervalos específicos.

Ensayo estático: el ensayo en que, a lo largo de su duración, no hay renovación de la solución de ensayo.

▼M1

Criterio del ensayo: el factor general que, como objetivo del ensayo, es modificado por la sustancia problema respecto al control. En este método el criterio del ensayo es la inhibición del crecimiento, que se puede expresar mediante diferentes variables de respuesta, basadas en una o más variables de medición.

Medio de ensayo: el medio de cultivo sintético y completo en que crecen las plantas del ensayo cuando se exponen a la sustancia problema. Esta se disuelve en principio en el medio de ensayo.

Rendimiento: el valor de una variable de medición para expresar la biomasa al final del período de exposición menos el valor de la variable de medición al inicio del período de exposición.

1.3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Se cultivan plantas del género *Lemna* en fase de crecimiento exponencial como monocultivos expuestos a diferentes concentraciones de la sustancia problema durante un plazo de siete días. El objetivo del ensayo es cuantificar el efecto producido por la sustancia sobre el crecimiento vegetativo a lo largo de este plazo, a partir de la evaluación de unas variables de medición seleccionadas. La variable de medición primaria es el número de frondas. Se mide también al menos otra variable de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco), ya que algunas sustancias pueden afectar a otras variables de medición mucho más que al número de frondas. Para cuantificar los efectos debidos a la sustancia, se compara el crecimiento en las soluciones de ensayo con el de los controles y se determina la concentración que ocasiona una inhibición del crecimiento de un porcentaje especificado (por ejemplo, 50 %), la cual se expresa como EC_x (por ejemplo, EC_{50}).

El criterio final es la inhibición del crecimiento, expresado como incremento logarítmico de la variable de medición (tasa media de crecimiento específico) durante el tiempo de exposición. A partir de las tasas medias de crecimiento específico registradas en una serie de soluciones de ensayo, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % de la tasa de crecimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como EC_{tx} (por ejemplo, EC_{t50}).

Otra variable de respuesta utilizada en este método de ensayo es el rendimiento, lo que puede ser necesario en algunos países para cumplir obligaciones específicas derivadas de la normativa. Se define como las variables de medición al final del tiempo de exposición menos las variables de medición al inicio de este tiempo. A partir del rendimiento registrado en una serie de soluciones de ensayo, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % del rendimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como EC_{rx} (por ejemplo, EC_{r50}).

Además, pueden determinarse estadísticamente la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC).

1.4. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Debe contarse con un método analítico que tenga la sensibilidad adecuada para cuantificar la sustancia en el medio de ensayo.

▼M1

Entre la información sobre la sustancia problema que puede ser útil para establecer las condiciones del ensayo está lo siguiente: fórmula estructural, pureza, hidrosolubilidad, estabilidad en el agua, pK_a, K_{ow}, presión de vapor y biodegradabilidad. La hidrosolubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará la probabilidad de la pérdida de cantidades significativas de sustancia problema durante el tiempo del ensayo. Esto contribuirá a indicar si deben tomarse medidas particulares para limitar tal pérdida. Cuando sea incierta la información sobre la solubilidad y estabilidad de la sustancia problema, se recomienda que se evalúen dichos aspectos en las condiciones del ensayo, es decir, con el medio de cultivo, la temperatura y el régimen de iluminación que se vayan a utilizar en el ensayo.

Cuando sea particularmente importante el control del pH del medio de ensayo, por ejemplo cuando se estudien metales o sustancias hidrolíticamente inestables, se recomienda añadir un tampón al medio de cultivo (véase el párrafo primero del punto 1.7.4). En la referencia (11) se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos.

1.5. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Para comprobar el procedimiento del ensayo pueden someterse al mismo sustancias de referencia, como el 3,5-diclorofenol utilizado en el ensayo de intercalibración internacional (10). Se recomienda efectuar un ensayo con una sustancia de referencia al menos dos veces al año o, si la frecuencia de los ensayos es menor, en paralelo con la determinación de la toxicidad de una sustancia problema.

1.6. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido, el tiempo de duplicación del número de frondas en el control debe ser inferior a 2,5 días (60 h), lo que corresponde a una multiplicación por siete en el plazo de siete días y a una tasa media de crecimiento específico de 0,275 d^{-1}. Con los medios y condiciones de ensayo descritos en el presente método, este criterio puede cumplirse utilizando un régimen estático (8). También se prevé que este criterio se pueda cumplir en condiciones semiestáticas y dinámicas. En el punto 2.1 se muestra cómo calcular el tiempo de duplicación.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1. **Equipo**

Todo el equipo que entre en contacto con los medios de ensayo será de vidrio o de otro material químicamente inerte. El material de vidrio utilizado para el cultivo y el ensayo estará limpio de contaminantes químicos que puedan pasar al medio de ensayo y además será estéril. Los recipientes de ensayo tendrán la anchura suficiente para que las frondas de las diferentes colonias de los recipientes de control puedan crecer sin solaparse al final del ensayo. No importa si las raíces tocan el fondo de los recipientes de ensayo, pero se recomienda una profundidad mínima de 20 mm y un volumen mínimo de 100 ml en cada recipiente de ensayo. Siempre que se respeten estas normas, no es fundamental el tipo de recipiente de ensayo: se ha visto que son adecuados tanto los vasos de precipitados como los cristalizadores o las placas Petri de vidrio de dimensiones adecuadas. Los recipientes de ensayo estarán cubiertos para minimizar la evaporación y la contaminación accidental, pero sin impedir el necesario intercambio de gases. Los recipientes de ensayo y, en particular, las tapas serán tales que eviten la formación de sombras o la modificación de las características espectrales de la luz.

▼M1

No se tendrán juntos los cultivos y los recipientes de ensayo, y la mejor forma de conseguirlo es utilizar distintas cámaras, incubadoras o recintos de cultivo ambientales. Debe ser posible regular la iluminación y la temperatura, y mantenerlas a nivel constante (véase el punto 1.7.8).

1.7.2. **Organismo de ensayo**

El organismo utilizado para este ensayo es *L. gibba* o *L. minor*. En el apéndice 1 se recogen breves descripciones de especies de lenteja de agua que se han utilizado en ensayos de toxicidad. El material vegetal puede obtenerse de una colección de cultivos, de otro laboratorio o del campo. Si se recogen del campo, las plantas deben mantenerse cultivadas en el mismo medio que se vaya a utilizar para el ensayo al menos en las ocho semanas anteriores a esta utilización. Los lugares del campo utilizados para recoger los cultivos iniciales deben estar libres de fuentes de contaminación evidentes. Si se obtienen de otro laboratorio o de una colección de cultivos, deben mantenerse similarmente durante un mínimo de tres semanas. En el informe han de indicarse siempre el origen, la especie y el clon (si se conoce) del material vegetal utilizado para el ensayo.

Deben utilizarse monocultivos que estén claramente exentos de contaminación con otros organismos, como algas o protozoos. Las plantas sanas de *L. minor* consisten en colonias formadas por entre dos y cinco frondas, mientras que las colonias sanas de *L. gibba* pueden tener hasta siete frondas.

La calidad y la uniformidad de las plantas empleadas en el ensayo tendrán una influencia significativa sobre el resultado del mismo, por lo que deben seleccionarse con cuidado. Han de utilizarse plantas jóvenes, en fase de crecimiento rápido, que no presenten lesiones visibles ni cambios de color (clorosis). La buena calidad de un cultivo viene indicada por una elevada frecuencia de colonias con un mínimo de dos frondas. Un gran número de frondas aisladas indica problema ambiental, por ejemplo por limitación de nutrientes, y el material de estos cultivos no debe utilizarse en los ensayos.

1.7.3. **Cultivo**

Para reducir la frecuencia del mantenimiento del cultivo (por ejemplo, cuando no esté previsto efectuar ensayos con *Lemna* durante cierto tiempo), es posible mantener los cultivos en condiciones de iluminación y temperatura reducidas (4 a 10 °C). En el apéndice 2 se recoge información sobre el mantenimiento de los cultivos. Si se observan signos evidentes de contaminación por algas u otros organismos, habrá que proceder a la esterilización superficial de una submuestra de frondas de *Lemna*, seguida por su transferencia a medio fresco (véase el apéndice 2). En tal caso, se desechará el resto del cultivo contaminado.

Al menos siete días antes del ensayo, debe transferirse asépticamente a medio estéril fresco un número suficiente de colonias, que se cultivarán durante 7 a 10 días en las condiciones del ensayo.

1.7.4. **Medio de ensayo**

Se recomienda el uso de diferentes medios para *L. minor* y *L. gibba*, como se describe más abajo. Debe estudiarse cuidadosamente la inclusión de un tampón de pH en el medio de ensayo [ácido 4-morfolinopropano-sulfónico (MOPS), nº CAS: 1132-61-2; nº EINECS: 214-478-5) en medio de *L. minor*, y $NaHCO_3$ en medio de *L. gibba*] si se sospecha que puede reaccionar con la sustancia problema e influir en la expresión de su toxicidad. También es aceptable el medio de Steinberg (12), siempre que se cumplan los criterios de validez.

▼M1

Para el cultivo de *L. minor* y los ensayos con ella, se recomienda una modificación del medio de cultivo normal de Suecia (SIS) para *Lemna*, cuya composición figura en el apéndice 3.

Para el cultivo de *L. gibba* y los ensayos con ella, se recomienda el medio de cultivo 20X-AAP, tal como se describe en el apéndice 3.

El medio de Steinberg, como se describe en el apéndice 3, es también adecuado para *L. minor*, aunque puede utilizarse asimismo con *L. gibba* siempre que se cumplan los criterios de validez.

1.7.5. **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo se preparan normalmente diluyendo una solución madre. En principio, las soluciones madre de la sustancia problema se preparan disolviendo la sustancia en medio de cultivo.

La mayor concentración estudiada de la sustancia problema no debe superar como norma su hidrosolubilidad en las condiciones de ensayo. No obstante, ha de señalarse que *Lemna* spp. flotan en la superficie y pueden exponerse a sustancias que se acumulan en la interfase agua-aire (por ejemplo, sustancias hidrofóbicas o poco hidrosolubles, o sustancias tensoactivas). En tales circunstancias, la exposición se deberá a material que no está disuelto y las concentraciones de ensayo podrán superar la hidrosolubilidad, según las características de la sustancia problema. En caso de sustancias problema de escasa hidrosolubilidad, puede ser necesario preparar una dispersión o solución madre concentrada de la sustancia con un dispersante o disolvente orgánico para facilitar la adición de cantidades exactas de la sustancia problema al medio de ensayo y ayudar a su dispersión y disolución. No obstante, debe evitarse en la mayor medida posible el empleo de tales materiales. El uso de disolventes o dispersantes auxiliares no debe provocar fitotoxicidad. Por ejemplo, entre los disolventes utilizados frecuentemente que no causan fitotoxicidad a concentraciones de hasta 100 $\mu l \cdot l^{-1}$ figuran la acetona y la dimetilformamida. Si se utiliza un disolvente o dispersante, su concentración final se indicará en el informe y se mantendrá a un nivel mínimo ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), y todos los recipientes de tratamiento y de control contendrán la misma concentración de disolvente o dispersante. En la referencia (11) se da más información sobre el uso de dispersantes.

1.7.6. **Grupos de ensayo y controles**

Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas es útil disponer de datos anteriores sobre la toxicidad de la sustancia problema para *Lemna*, como, por ejemplo, datos procedentes de un ensayo preliminar. En el ensayo definitivo de toxicidad, deben emplearse al menos cinco concentraciones de ensayo dispuestas en progresión geométrica. Lo mejor es que la razón entre las concentraciones de ensayo no sea superior a 3,2, pero puede utilizarse un valor superior si la curva concentración-respuesta es plana. Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. De cada concentración de ensayo se utilizarán al menos tres réplicas en paralelo.

Al fijar el abanico de concentraciones de ensayo (para el ensayo de tanteo o para el ensayo definitivo de toxicidad), debe tenerse en cuenta lo siguiente:

▼M1

— Para determinar una EC_x, es necesario que las concentraciones de ensayo abarquen el valor de EC_x a fin de asegurar un nivel adecuado de confianza. Por ejemplo, si se estima la EC_{50}, la mayor concentración de ensayo debe ser superior al valor de EC_{50}. Si el valor de EC_{50} se encuentra fuera del abanico de las concentraciones de ensayo, los intervalos de confianza asociados serán amplios y quizá no sea posible efectuar una evaluación adecuada del ajuste estadístico del modelo.

— Si el objetivo es estimar la LOEC/NOEC, la menor concentración de ensayo debe ser tan baja que el crecimiento correspondiente no sea significativamente inferior al del control. Por otra parte, la mayor concentración de ensayo debe ser tan alta que el crecimiento correspondiente sea significativamente inferior al del control. Si no es así, habrá que repetir el ensayo utilizando un abanico diferente de concentraciones (salvo que la mayor concentración sea el límite de solubilidad o la concentración límite requerida máxima, por ejemplo 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Cada ensayo debe incluir controles con un medio nutritivo, número de frondas y colonias, condiciones ambientales y procedimientos iguales que los recipientes de ensayo, pero sin la sustancia problema. Si se utiliza un disolvente o dispersante auxiliar, se incluirá un control adicional con el disolvente o dispersante presente en la misma concentración que en los recipientes con la sustancia problema. El número de réplicas de los recipientes de control (y recipientes de disolventes, en su caso) será al menos igual al número de recipientes utilizados con cada concentración de ensayo, y preferentemente el doble de este número.

Si no es necesario determinar la NOEC, el diseño de la prueba puede modificarse para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración. Sin embargo, el número de réplicas de los controles será al menos de tres.

1.7.7. **Exposición**

Se transfieren desde el cultivo de inóculo colonias formadas por entre 2 y 4 frondas visibles, repartiéndose aleatoriamente entre los recipientes de ensayo en condiciones asépticas. Cada recipiente de ensayo debe contar con un total de 9 a 12 frondas. En cada uno de ellos habrá el mismo número de frondas y colonias. La experiencia obtenida con este método y los datos del ensayo de intercalibración indican que el uso de tres réplicas por tratamiento, contando cada una de ellas inicialmente con entre 9 y 12 frondas, es suficiente para detectar diferencias en el crecimiento del orden del 4 al 7 % de la inhibición calculada en tasa de crecimiento (del 10 al 15 % calculada en rendimiento) entre tratamientos (10).

Es necesario un diseño aleatorio de la distribución de los recipientes de ensayo en la incubadora para minimizar la influencia de las diferencias espaciales de intensidad luminosa o temperatura. También es necesario un diseño por bloq ues o una redistribución aleatoria de los recipientes cuando se hacen observaciones (o una redistribución más frecuente).

▼M1

Si un ensayo previo de estabilidad indica que la concentración de sustancia problema no puede mantenerse (es decir, que la concentración medida cae por debajo del 80 % de la concentración medida inicialmente) a lo largo de la duración del ensayo (7 días), se recomienda un régimen de ensayo semiestático. En tal caso, las colonias deben exponerse a soluciones de ensayo y control recién preparadas en al menos dos ocasiones durante el ensayo (por ejemplo, en los días 3 y 5). La frecuencia de la exposición al medio fresco dependerá de la estabilidad de la sustancia problema; puede ser necesaria una frecuencia mayor para mantener concentraciones cuasi constantes de sustancias muy inestables o volátiles. En ciertas circunstancias puede hacer falta un procedimiento dinámico (11) (13).

La posibilidad de exposición mediante aplicación foliar (aerosol) no se contempla en el presente método de ensayo; véase en cambio la referencia (14).

1.7.8. **Condiciones de incubación**

Debe utilizarse continuamente una luz fluorescente blanca fría o cálida que dé una intensidad luminosa seleccionada en el intervalo de 85 a 135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ cuando se mide en una radiación activa para la fotosíntesis (400 a 700 nm) en puntos situados a la misma distancia de la fuente luminosa que las frondas de *Lemna* (equivalente a 6 500 a 10 000 lux). Las diferencias respecto a la intensidad luminosa seleccionada no deben superar el ± 15 % en toda la superficie de ensayo. El método de detección y medición de la luz, en particular el tipo de sensor, influye en el valor medido. La utilización de sensores esféricos (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima y por debajo del plano de medición) y de sensores de «coseno» (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima del plano de medición) es mejor que la de sensores unidireccionales, y proporciona lecturas más elevadas con una fuente luminosa multipuntual del tipo que se describe aquí.

La temperatura de los recipientes de ensayo debe ser de 24 ± 2 °C. El pH del medio de control no debe subir más de 1,5 unidades durante el ensayo. Sin embargo, una desviación superior a 1,5 unidades no invalidaría el ensayo si puede demostrarse que se cumplen los criterios de validez. Es necesario prestar especial atención a la deriva del pH en casos especiales, como cuando se estudian metales o sustancias inestables. En la referencia (11) puede encontrarse más información al respecto.

1.7.9. **Duración**

El ensayo termina a los siete días de la transferencia de las plantas a los recipientes de ensayo.

1.7.10. **Mediciones y determinaciones analíticas**

Al inicio del ensayo, se cuenta y registra el número de frondas de los recipientes de ensayo, velando por tener en cuenta las frondas prominentes y claramente visibles. Es necesario determinar el número de frondas de aspecto normal o anormal al inicio del ensayo, al menos una vez cada tres días durante el plazo de exposición (es decir, al menos dos veces durante el período de 7 días) y al final del ensayo. Deben anotarse los cambios observados en el desarrollo de las plantas como, por ejemplo, en el tamaño, aspecto, indicación de necrosis, clorosis o protuberancias, rotura de colonias o pérdida de flotabilidad de las frondas, así como en la longitud y aspecto de las raíces. Deben registrarse también las características significativas del medio de ensayo (por ejemplo, presencia de material sin disolver o crecimiento de algas en el recipiente de ensayo).

▼M1

Además del recuento del número de frondas durante el ensayo, hay que evaluar los efectos de la sustancia problema sobre una o más de las siguientes variables de medición:

i) superficie total de las frondas,

ii) peso seco,

iii) peso fresco.

La superficie total de las frondas tiene la ventaja de que puede determinarse en cada recipiente de ensayo y de control al principio y al final del ensayo, así como durante el mismo. El peso seco o fresco debe determinarse al principio del ensayo a partir de una muestra de cultivo del inóculo representativa del utilizado para empezar el ensayo, y al final de este con el material vegetal de cada recipiente de ensayo y de control. Si no se mide la superficie de las frondas, es mejor determinar el peso seco que el peso fresco.

La superficie total de las frondas, el peso seco y el peso fresco pueden determinarse de la forma siguiente:

i) *Superficie total de las frondas*: La superficie total de las frondas de todas las colonias puede determinarse por análisis de imágenes. Puede captarse el contorno del recipiente de ensayo y de las plantas mediante una cámara de vídeo (es decir, poniendo el recipiente en una caja de luz), y después se digitaliza la imagen resultante. A continuación puede determinarse la superficie total de las frondas de un recipiente de ensayo calibrando con plantillas de superficie conocida. Debe procurarse evitar las interferencias debidas al borde del recipiente de ensayo. Otra posibilidad, pero más laboriosa, consiste en fotografiar los recipientes de ensayo y las plantas, recortar el contorno obtenido de las colonias y determinar su superficie mediante un analizador de superficie de hojas o papel milimetrado. También pueden ser adecuadas otras técnicas (por ejemplo, el cociente entre el peso del papel correspondiente a la superficie del contorno de las colonias y el de la superficie unitaria).

ii) *Peso seco*: Se recogen todas las colonias de cada uno de los recipientes de ensayo y se lavan con agua destilada o desionizada. Se secan con material absorbente para eliminar el exceso de agua y después se calientan a 60 °C hasta llegar a peso constante. Deben incluirse los eventuales fragmentos de raíces. El peso seco se expresará con una precisión mínima de 0,1 mg.

iii) *Peso fresco*: Todas las colonias se transfieren a tubos de poliestireno (u otro material inerte), pesados previamente, con pequeños agujeros (de 1 mm) en los fondos redondeados. A continuación se centrifugan los tubos a 3 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se vuelven a pesar los tubos, que contienen las colonias ahora secadas, y el peso fresco se calcula restando el peso del tubo vacío.

1.7.10.1. *Frecuencia de las mediciones y determinaciones analíticas*

Si se utiliza un ensayo estático, debe medirse el pH de cada tratamiento al inicio y al final del ensayo. Si el ensayo es semiestático, el pH debe medirse en cada lote de solución de ensayo «fresca» antes de cada renovación y también en las correspondientes soluciones «viejas».

▼M1

Debe medirse la intensidad luminosa en la cámara de crecimiento, incubadora o recinto de cultivo, en puntos situados a la misma distancia de la fuente luminosa que las frondas de *Lemna*. Esta medición debe efectuarse al menos una vez durante el ensayo. Debe registrarse al menos una vez al día la temperatura del medio en un recipiente indicador mantenido en las mismas condiciones en la cámara, incubadora o recinto de cultivo.

Las concentraciones de la sustancia problema se determinarán durante el ensayo a intervalos adecuados. Con ensayos estáticos, el requisito mínimo es determinar las concentraciones al inicio y al final del ensayo.

Con ensayos semiestáticos en que no se prevea que la concentración de sustancia problema permanezca en el intervalo del ± 20 % de la concentración nominal, habrá que analizar todas las soluciones de ensayo recién preparadas y las mismas soluciones en cada renovación (véase el párrafo tercero del punto 1.7.7). No obstante, en los ensayos en los que la concentración inicial medida de la sustancia problema no esté dentro del intervalo del ± 20 % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80 a 120 % de la concentración inicial), las determinaciones químicas podrían limitarse a las concentraciones de ensayo máxima y mínima. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de la sustancia problema antes de la renovación solo tendrá que efectuarse en uno de los recipientes replicados de cada concentración de ensayo (o en los contenidos reunidos de los recipientes replicados).

Si se utiliza un ensayo dinámico, será adecuado un régimen de muestreo similar al descrito para los ensayos semiestáticos, incluido el análisis al inicio, a la mitad y al final del ensayo, pero en este caso no será apropiado efectuar mediciones de las soluciones «gastadas». En este tipo de ensayo habrá que comprobar diariamente el caudal de solución madre de sustancia problema o de diluyente y sustancia problema.

Si está demostrado que la concentración de la sustancia problema se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro del intervalo del ± 20 % de la concentración nominal o medida inicialmente, el análisis de los resultados puede basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación respecto a la concentración nominal o medida inicialmente es superior al ± 20 %, el análisis de los resultados deberá basarse en la media geométrica de la concentración durante la exposición o en modelos que describan el descenso de la concentración de la sustancia problema (11).

1.7.11. **Ensayo límite**

Bajo ciertas circunstancias, por ejemplo cuando un ensayo preliminar indica que la sustancia problema no tiene efectos tóxicos a concentraciones de hasta 100 $mg \cdot l^{-1}$, o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo si este valor es más bajo, puede efectuarse un ensayo límite comparando las respuestas de un grupo de control y de un único grupo de tratamiento (100 $mg \cdot l^{-1}$ o una concentración igual al límite de solubilidad). Se recomienda vivamente que esto se apoye en un análisis de la concentración de exposición. Todas las condiciones de ensayo y criterios de validez antes descritos son aplicables al ensayo límite, con la excepción de que el número de réplicas de tratamiento ha de duplicarse. El crecimiento en el grupo de control y en el de tratamiento pueden analizarse mediante un método estadístico para comparar las medias como, por ejemplo, una prueba t de Student.

▼M1

2. **DATOS E INFORME**

2.1. TIEMPO DE DUPLICACIÓN

Para determinar el tiempo de duplicación (T_d) del número de frondas y el cumplimiento de este criterio de validez por el estudio (punto 1.6), se aplicará la fórmula siguiente con datos obtenidos de los recipientes de control:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

donde μ es la tasa media de crecimiento específico determinada como se describe en los párrafos primero y segundo del punto 2.2.1.

2.2. VARIABLES DE RESPUESTA

El objetivo del ensayo es determinar los efectos de la sustancia problema sobre el crecimiento vegetativo de *Lemna*. El presente método de ensayo describe dos variables de respuesta, ya que los Estados miembros tienen distintas preferencias y necesidades normativas. Para que los resultados del ensayo sean aceptables en todos los Estados miembros, los efectos deben evaluarse utilizando las dos variables de respuesta a) y b) que se describen a continuación:

a) Tasa media de crecimiento específico: Esta variable de respuesta se calcula a partir del cambio del logaritmo del número de frondas y, además, a partir del cambio del logaritmo de otro parámetro de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco) a lo largo del tiempo (expresado en días) en los controles y en cada grupo de tratamiento. A veces se denomina tasa de crecimiento relativa (15).

b) Rendimiento: Esta variable de respuesta se calcula a partir del cambio del número de frondas y, además, a partir del cambio de otro parámetro de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco) en los controles y en cada grupo de tratamiento hasta el final del ensayo.

Ha de señalarse que los valores de toxicidad calculados a partir de estas dos variables de respuesta no son comparables y es necesario tener en cuenta esta diferencia cuando se utilicen los resultados del ensayo. Los valores de EC_x basados en la tasa media de crecimiento específico (EC_{tx}) son normalmente más elevados que los basados en el rendimiento (EC_{rx}) si se respetan las condiciones del presente método de ensayo, debido al fundamento matemático de los planteamientos respectivos. Esto no debe interpretarse como una diferencia en la sensibilidad de las dos variables de respuesta, sino como una diferencia puramente matemática entre los valores. El concepto de tasa media de crecimiento específico se basa en el modelo general de crecimiento exponencial de la lenteja de agua en cultivos no limitados, en que la toxicidad se estima en función de los efectos sobre la tasa de crecimiento, sin depender del nivel absoluto de la tasa de crecimiento específico del control, de la pendiente de la curva concentración-respuesta ni de la duración del ensayo. Por el contrario, los resultados basados en la variable de respuesta «rendimiento» dependen de todas estas otras variables. La EC_{rx} depende de la tasa de crecimiento específico de la especie de lenteja de agua utilizada en cada ensayo y de la tasa máxima de crecimiento específico, que puede variar de una especie a otra e incluso de un clon a otro. Esta variable de respuesta no debe utilizarse para comparar la sensibilidad de distintas especies, o incluso distintos clones, de lenteja de agua ante un agente tóxico. Aunque científicamente se prefiere el uso de la tasa media de crecimiento específico para estimar la toxicidad, en el presente método de ensayo se incluye también la estimación a partir del rendimiento para cumplir los requisitos normativos vigentes en ciertos países.

▼M1

Las estimaciones de la toxicidad deben basarse en el número de frondas y en otra variable de medición más (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco), porque ciertas sustancias pueden afectar a otras variables de medición mucho más que al número de frondas. Este efecto no se detectaría si solo se calculará el número de frondas.

El número de frondas y las otras variables de medición registradas (es decir, la superficie total de las frondas, el peso seco o el peso fresco), se tabulan junto con las concentraciones de esa sustancia problema correspondientes a cada punto de medición. Todo análisis posterior de los datos, por ejemplo para estimar la LOEC, NOEC o EC_x, se basará en los valores de las distintas réplicas y no en los promedios calculados de cada grupo de tratamiento.

2.2.1. **Tasa media de crecimiento específico**

La tasa media de crecimiento específico correspondiente a un período específico se calcula como el incremento logarítmico de las variables de crecimiento, es decir, número de frondas y otra variable de medición (área total de las frondas, peso seco o peso fresco), aplicando la fórmula siguiente a cada réplica de control y de tratamiento:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

donde:

— μ_{i-j} es la tasa media de crecimiento específico entre el tiempo *i* y el *j*

— N_i es la variable de medición del recipiente de ensayo o de control en el tiempo *i*

— N_j es la variable de medición del recipiente de ensayo o de control en el tiempo *j*

— t es el tiempo transcurrido entre *i* y *j*.

Respecto a cada grupo de tratamiento y de control ha de calcularse un valor promedio de la tasa de crecimiento con una estimación de la varianza.

Debe calcularse la tasa media de crecimiento específico correspondiente a toda la duración del ensayo (el tiempo *i* en la fórmula anterior es el principio del ensayo y el tiempo *j* es el final del mismo). Respecto a cada concentración de ensayo y control ha de calcularse un valor promedio de la tasa media de crecimiento específico con una estimación de la varianza. Por otra parte, debe considerarse la tasa de crecimiento de cada sección para evaluar el efecto de la sustancia problema presente durante el período de exposición (por ejemplo, examinando curvas logarítmicas de crecimiento). Una diferencia importante entre la tasa de crecimiento de cada sección y la tasa media de crecimiento indica una desviación respecto al crecimiento exponencial constante e impone el examen en detalle de las curvas de crecimiento. En este caso, un enfoque prudente sería comparar las tasas de crecimiento específico de cultivos tratados durante el tiempo de inhibición máxima con las correspondientes a los controles durante el mismo tiempo.

▼M1

Después puede calcularse el porcentaje de inhibición en tasa de crecimiento (I_t) correspondiente a cada concentración de ensayo (grupo de tratamiento) aplicando la fórmula siguiente:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

donde:

— $\% I_t$ es el porcentaje de inhibición en tasa media de crecimiento específico

— μ_C es el valor promedio de μ en el grupo de control

— μ_T es el valor promedio de μ en el grupo de tratamiento.

2.2.2. **Rendimiento**

Los efectos sobre el rendimiento se determinan a partir de dos variables de medición, el número de frondas y otra variable de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco) observadas en cada recipiente de ensayo al inicio y al final del ensayo. En el caso del peso seco o del peso fresco, la biomasa inicial se determina a partir una muestra de frondas tomada del mismo lote utilizado para inocular los recipientes de ensayo (véase el párrafo segundo del punto 1.7.3). Respecto a cada concentración de ensayo y control ha de calcularse un valor promedio del rendimiento con una estimación de la varianza. El porcentaje promedio de inhibición en rendimiento ($\% I_y$) puede calcularse de la manera siguiente con cada grupo de tratamiento:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

donde:

— $\% I_y$ es el porcentaje de reducción en rendimiento

— b_C es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo de control

— b_T es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo de tratamiento.

2.2.3. **Trazado de las curvas concentración-respuesta**

Se trazarán las curvas concentración-respuesta que relacionan el porcentaje promedio de inhibición de la variable de respuesta (I_r o I_y, calculado como se indica en el último párrafo del punto 2.2.1 o en el punto 2.2.2) con el logaritmo de la concentración de la sustancia problema

2.2.4. **Estimación de ECx**

Las estimaciones de EC_x (por ejemplo, EC_{50}) deben basarse tanto en la tasa media de crecimiento específico (EC_{tx}) como en el rendimiento (EC_{rx}), cada uno de los cuales debe basarse, a su vez, en el número de frondas y en una variable de medición más (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco). El motivo es que ciertas sustancias problema influyen de forma diferente en el número de frondas y en otras variables de medición. Por tanto, los parámetros buscados de la toxicidad son cuatro valores de EC_x por cada nivel de inhibición x calculado: EC_{tx} (número de frondas); EC_{tx} (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco); EC_{rx} (número de frondas); y EC_{rx} (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco).

▼M1

2.3. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

El objetivo es obtener una relación cuantitativa concentración-respuesta mediante análisis de regresión. Es posible utilizar una regresión lineal ponderada después de haber efectuado una linealización de los datos de respuesta como, por ejemplo, en probit o logit o unidades Weibull (16), pero son preferibles los procedimientos de regresión no lineal porque con ellos se tratan mejor las inevitables irregularidades de los datos y las desviaciones respecto a distribuciones suaves. Si la inhibición está próxima al 0 o al 100 %, la transformación puede magnificar tales irregularidades, interfiriendo así con el análisis (16). Debe señalarse que los métodos normales de análisis que utilizan las transformaciones en probit, logit o de Weibull están previstos para aplicarse a datos cuantales (por ejemplo, mortalidad o supervivencia), y que es necesario modificarlos para aplicarlos a datos de tasas de crecimiento o rendimiento. En las referencias (17), (18) y (19) pueden encontrarse métodos específicos de determinación de los valores de EC_x a partir de datos continuos.

Respecto a cada variable de respuesta que haya de analizarse, se utilizará la relación concentración-respuesta para calcular estimaciones puntuales de los valores de EC_x. Cuando sea posible, se determinarán los límites de confianza del 95 % de cada estimación. La bondad del ajuste de los datos de respuesta al modelo de regresión se evaluará de forma gráfica o estadística. El análisis de regresión se efectuará utilizando las respuestas de las distintas réplicas y no los promedios de los grupos de tratamiento.

Las estimaciones de la EC_{50} y los límites de confianza pueden obtenerse también utilizando la interpolación lineal con remuestreo (*bootstrapping*) (20) si los métodos o modelos de regresión disponibles no son adecuados para los datos.

Para la estimación de los valores de LOEC y, por tanto, de NOEC, es necesario comparar los promedios de tratamiento utilizando técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se ha de comparar el promedio obtenido a cada concentración con el del control, aplicando un método apropiado de comparación múltiple o de prueba de tendencia. Las pruebas de Dunnett o Williams pueden ser útiles (21) (22) (23) (24). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Esta comprobación puede realizarse gráficamente o mediante una prueba en regla (25). Son adecuadas las pruebas de Levene o Bartlett. El incumplimiento de la hipótesis de homogeneidad de las varianzas puede corregirse a veces mediante la transformación logarítmica de los datos. Si la heterogeneidad de la varianza es extrema y no puede corregirse mediante transformación, ha de considerarse la posibilidad de efectuar un análisis por métodos como las pruebas de tendencia de Jonkheere de ajuste secuencial de residuos. En la referencia (19) puede encontrarse más información sobre la determinación de la NOEC.

Los recientes avances científicos han llevado a recomendar el abandono del concepto de NOEC para sustituirlo por el de estimaciones puntuales de EC_x basadas en la regresión. Aún no se ha determinado un valor adecuado de *x* para esta prueba con *Lemna*. Sin embargo, parece que es apropiado el intervalo del 10 al 20 % (según la variable de respuesta elegida) y lo mejor es indicar tanto la EC_{10} como la EC_{20}.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas, incluido el límite de hidrosolubilidad,

▼M1

— datos de identificación química (por ejemplo, número CAS), incluida la pureza.

Especie de ensayo:

— nombre científico, clon (si se conoce) y procedencia.

Condiciones de ensayo:

— procedimiento de ensayo aplicado (estático, semiestático o dinámico),

— fecha de inicio y duración del ensayo,

— medio de ensayo,

— descripción del diseño experimental: recipientes de ensayo y sus tapas, volúmenes de solución, número de colonias y de frondas por recipiente de ensayo al inicio del ensayo,

— concentraciones de ensayo (nominales y medidas, según proceda) y número de réplicas por concentración,

— métodos de preparación de las soluciones madre y problema, incluido el eventual uso de disolventes o dispersantes,

— temperatura durante el ensayo,

— fuente, intensidad y homogeneidad de la luz,

— valores de pH de los medios de ensayo y de control,

— concentraciones de la sustancia problema y método de análisis con datos adecuados de evaluación de la calidad (estudios de validación, desviaciones típicas o límites de confianza de los análisis),

— métodos de determinación del número de frondas y otras variables de medición como, por ejemplo, el peso seco, el peso fresco o la superficie de las frondas,

— todas las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

Resultados:

— datos en bruto: número de frondas y otras variables de medición en cada recipiente de ensayo y de control en cada observación y momento de análisis,

— medias y desviaciones típicas de cada variable de medición,

— curvas de crecimiento de cada concentración (se recomienda con transformación logarítmica de la variable de medición, véase el párrafo segundo del punto 2.2.1),

— tiempo de duplicación/tasa de crecimiento en el control según el número de frondas,

— variables de respuesta calculadas de cada réplica de tratamiento, con valores medios y coeficiente de variación de las réplicas,

— representación gráfica de la relación concentración-efecto,

— estimaciones de parámetros de la toxicidad correspondientes a variables de respuesta, por ejemplo, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e intervalos de confianza asociados. En caso de que se calculen la LOEC o la NOEC, se indicarán sus valores y los métodos estadísticos utilizados en su determinación,

▼M1

— si se ha utilizado el ANOVA, el tamaño del efecto que puede observarse (por ejemplo, la diferencia significativa mínima),

— la eventual estimulación del crecimiento que se haya observado en cualquier recipiente de tratamiento,

— los eventuales signos visuales de fitotoxicidad así como observaciones de las soluciones de ensayo,

— discusión de los resultados, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OECD TG 221 (2006). *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

(2) El uso de estudios con *Lemna* sobre sustancias coloreadas se detalla en la sección 13.5.3 del Manual de Decisiones de la UE de julio de 2006, en http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals (solo en inglés).

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3, Summary of difficult substance testing issues, disponible en:

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A.

(4) ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998), pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

(6) AFNOR — Association Française de Normalisation (1996). XP T 90-337. Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, 10 pp.

(7) SSI — Swedish Standards Institute (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13, 15 pp. (en sueco).

(8) Environment Canada (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37, 120 pp.

(9) Environment Canada (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims, I., Whitehouse, P., y Lacey, R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge, C.T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(14) Lockhart, W.L., Billeck, B.N., y Baron, C.L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

(15) Huebert, D.B., y Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(17) Nyholm, N., Sørensen, P.S., Kusk, K.O., y Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(18) Bruce, R.D., y Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

(19) OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King, T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(23) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(24) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(25) Brain, P., y Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

Apéndice 1

Descripción de *Lemna* spp.

La planta acuática denominada vulgarmente lenteja de agua, *Lemna* spp., pertenece a la familia *Lemnaceae*, que tiene varias especies de distribución mundial recogidas en cuatro géneros. Se han descrito exhaustivamente sus diferencias de aspecto y taxonomía (1) (2). *L. gibba* y *L. minor* son especies representativas de las zonas templadas y se utilizan frecuentemente en estudios de toxicidad. Ambas especies tienen un tallo discoidal (fronda) flotante o sumergido y una raíz muy fina que sale del centro de la superficie inferior de cada fronda. Las especies de *Lemna* no suelen echar flores, y las plantas se reproducen vegetativamente haciendo nuevas frondas (3). En comparación con las plantas viejas, las jóvenes tienden a ser más pálidas, tener raíces más cortas y consistir en dos o tres frondas de distintos tamaños. El pequeño tamaño, la sencillez de la estructura, la reproducción asexual y el breve tiempo de generación de *Lemna* son características que convierten a las plantas de este género en idóneas para los ensayos de laboratorio (4) (5).

Debido a la probabilidad de que haya diferencias de sensibilidad entre las especies, solo son válidas las comparaciones de sensibilidad dentro de una misma especie.

Ejemplos de especies de *Lemna* que se utilizan en los ensayos: Referencias sobre las especies

L. aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

L. major: Clark, N.A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

L. minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156, 8 pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, 10 pp.

Swedish Standards Institute (SIS) (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *L. minor*, duckweed. SS 02 82 13, 15 pp. (en sueco).

L. gibba: ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *L. gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998), pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156, 8 pp.

L. paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

L. perpusilla: Clark, J.R., et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

L. trisulca: Huebert, D.B., Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼M1

L. valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Fuentes de especies de Lemna

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto, Toronto, Ontario
CANADÁ, M5S 3 B2
Tel. (1-416) 978 36 41
Fax (1-416) 978 58 78
Dirección electrónica: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
ESTADOS UNIDOS
Tel. (001-919) 515 75 72
Dirección electrónica: astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Estocolmo
SUECIA
Tel. (46-8) 674 72 40
Fax (46-8) 674 76 36

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlín
ALEMANIA
Dirección electrónica: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Bibliografía

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*), vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zúrich, Suiza.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M1**

Apéndice 2

Mantenimiento de cultivos de inóculo

Los cultivos de inóculo pueden mantenerse a temperaturas bajas (4 a 10 °C) durante tiempos prolongados sin tener que volver a obtenerlos. El medio de cultivo de *Lemna* puede ser el mismo que se utilice en los ensayos, pero también pueden utilizarse otros medios ricos en nutrientes para los cultivos de inóculo.

Periódicamente se pasan varias plantas jóvenes, de color verde claro, a nuevos recipientes de cultivo con medio fresco, aplicando una técnica aséptica. En las condiciones de baja temperatura que se indican, pueden hacerse subcultivos a intervalos de hasta tres meses.

Para los cultivos deben utilizarse recipientes estériles de vidrio, químicamente limpios (lavados con ácido); su manipulación se hará asépticamente. En caso de contaminación del cultivo de inóculo, por ejemplo con algas u hongos, se tomarán medidas para eliminar los organismos contaminantes. En relación con las algas y la mayoría de otros organismos contaminantes, esto puede efectuarse mediante esterilización superficial. Se toma una muestra del material vegetal contaminado y se cortan las raíces. A continuación se agita enérgicamente el material en agua limpia, y después se sumerge en solución de hipoclorito sódico al 0,5 % (v/v) durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 5 minutos. Seguidamente se enjuaga el material vegetal con agua estéril y se transfiere, en una serie de lotes, a recipientes de cultivo con medio de cultivo fresco. Aunque este tratamiento puede ocasionar la muerte de muchas frondas, especialmente con tiempos largos de exposición, algunas de las frondas supervivientes estarán normalmente libres de contaminación y podrán utilizarse para reinocular nuevos cultivos.

▼M1

Apéndice 3

Medios

Se recomiendan medios de cultivo distintos para *L. minor* y *L. gibba*. Para *L. minor* se recomienda una modificación del medio de cultivo normal de Suecia (SIS), y para *L. gibba*, el medio 20X-AAP. A continuación se indican las composiciones de ambos medios. Para prepararlos deben utilizarse sustancias de grado analítico o reactivo y agua desionizada.

Medio de cultivo normal de Suecia (SIS) para *Lemna*

— Las soluciones madre I a V se esterilizan en autoclave (120 °C, 15 minutos) o mediante filtración por membrana (de unos 0,2 μm de diámetro de poro).

— Las soluciones VI y, en su caso, VII se esterilizan solo mediante filtración por membrana; no deben tratarse en autoclave.

— Las soluciones madre estériles deben conservarse en lugar fresco y oscuro. Las soluciones madre I a V pueden conservarse hasta seis meses, mientras que la soluciones VI y, en su caso, VII deben desecharse al cabo de un solo mes.

Solución madre nº	Sustancia	Concentración en la solución madre ($g \cdot l^{-1}$)	Concentración en el medio preparado ($g \cdot l^{-1}$)	Medio preparado	
				Elemento	Concentración ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $\cdot 2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampón)	490	490	—	—

— Para preparar un litro de medio SIS, se añaden los volúmenes siguientes a 900 ml de agua desionizada:

— 10 ml de solución madre I

— 5 ml de solución madre II

— 5 ml de solución madre III

— 5 ml de solución madre IV

▼M1

— 1 ml de solución madre V

— 5 ml de solución madre VI

— 1 ml de solución madre VII (opcional).

Nota: Con ciertas sustancias problema (véase el último párrafo del punto 1.4) puede ser necesaria además la solución madre VII [tampón de ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS)].

— El pH se ajusta a 6,5 ± 0,2 con HCl o NaOH 0,1 o 1 M, y el volumen se lleva a un litro con agua desionizada.

Medio de cultivo 20X-AAP

Las soluciones madre se preparan con agua destilada o desionizada estéril.

Las soluciones madre estériles deben conservarse en lugar fresco y oscuro. En estas condiciones pueden mantenerse durante al menos 6 u 8 semanas.

Para obtener este medio 20X-AAP se necesitan cinco soluciones madre de nutrientes (A1, A2, A3, B y C), preparadas con sustancias de grado reactivo. A unos 850 ml de agua desionizada se añaden 20 ml de cada solución madre de nutrientes para obtener el medio de cultivo. El pH se ajusta a 7,5 ± 0,1 con HCl o NaOH 0,1 o 1 M, y el volumen se lleva a un litro con agua desionizada. Después se pasa el medio a un recipiente estéril a través de un filtro de membrana de unos 0,2 μm.

El medio de cultivo debe prepararse uno o dos días antes de su utilización en los ensayos, a fin de que el pH pueda estabilizarse. Antes de utilizar el medio de cultivo, se comprobará su pH y, en caso necesario, se ajustará añadiendo NaOH o HCl 0,1 o 1 M, como se describe más arriba.

Solución madre nº	Sustancia	Concentración en la solución madre ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Concentración en el medio preparado ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Medio preparado	
				Elemento	Concentración ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Salvo que se indique otra cosa.

▼M1

Nota: La concentración final teóricamente adecuada de bicarbonato (para evitar un ajuste apreciable del pH) es de 15 mg/l, y no de 300 mg/l. Sin embargo, la experiencia con el medio 20X-AAP, incluido el ensayo de intercalibración relativo al presente método, se basa en 300 mg/l (I. Sims, P. Whitehouse y R. Lacey (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency).

Medio de Steinberg (según ISO 20079)

Concentraciones y soluciones madre

— El medio modificado de Steinberg se utiliza según la norma ISO 20079 con *L. minor* solo (ya que en esa norma solo se contempla *L. minor*), pero los ensayos muestran que pueden obtenerse buenos resultados también con *L. gibba*.

— Para preparar el medio deben utilizarse sustancias de grado analítico o reactivo y agua desionizada.

— A partir de soluciones madre se prepara el medio nutritivo o el medio diez veces más concentrado que permite una concentración máxima del medio sin precipitación.

Cuadro 1

Medio de Steinberg con pH estabilizado (modificado según Altenburger)

Sustancia		Medio nutritivo	
Macroelementos	Peso molecular	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Microelementos	Peso molecular	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA disódico $\cdot 2H_2O$	372,24	1 500,00	4,03

▼**M1**

Cuadro 2

Soluciones madre (macroelementos)

1. **Macroelementos (concentración 50 veces mayor)**	g/l
Solución madre 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Solución madre 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Solución madre 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Cuadro 3

Soluciones madre (microelementos)

2. **Microelementos (concentración 1 000 veces mayor)**	mg/l
Solución madre 4:	
H_3BO_3	120,0
Solución madre 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Solución madre 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Solución madre 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Solución madre 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA disódico $\cdot 2H_2O$	1 500,00

— Pueden reunirse las soluciones madre 2 y 3 por un lado y, aparte, de la 4 a la 7 (teniendo en cuenta las concentraciones establecidas).

— Para poder conservarlas más tiempo, hay que tratar las soluciones madre en autoclave a 121 °C durante 20 min o bien someterlas a esterilización por filtración (0,2 μm). Se recomienda vivamente someter la solución madre nº 8 a esterilización por filtración (0,2 μm).

Preparación de la concentración final de medio de Steinberg (modificado)

— Se añaden 20 ml de las soluciones madre 1, 2 y 3 (véase el cuadro 2) a unos 900 ml de agua desionizada para evitar la precipitación.

— Se añade 1,0 ml de las soluciones madre 4, 5, 6, 7 y 8 (véase el cuadro 3).

— El pH debe ser de 5,5 ± 0,2 (se ajusta añadiendo un volumen mínimo de solución de NaOH o HCl).

▼M1

— Se completa con agua hasta 1 000 ml.

— Si las soluciones madres están esterilizadas y se utiliza agua adecuada, no es necesario proceder a otra esterilización. Si se efectúa la esterilización del medio final, la solución madre nº 8 se añadirá después del pase por autoclave (a 121 °C durante 20 min).

Preparación del medio de Steinberg (modificado) de concentración 10 veces mayor para su conservación intermedia

— Se añaden 20 ml de las soluciones madre 1, 2 y 3 (véase el cuadro 2) a unos 30 ml de agua para evitar la precipitación.

— Se añade 1,0 ml de las soluciones madre 4, 5, 6, 7 y 8 (véase el cuadro 3). Se completa con agua hasta 100 ml.

— Si las soluciones madres están esterilizadas y se utiliza agua adecuada, no es necesario proceder a otra esterilización. Si se efectúa la esterilización del medio final, la solución madre nº 8 se añadirá después del pase por autoclave (a 121 °C durante 20 min).

— El pH del medio (concentración final) debe ser de 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 218 (2004). Está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada de sustancias sobre las larvas del díptero de agua dulce *Chironomus* sp., que viven en los sedimentos. Se basa en los actuales protocolos de ensayo de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus tentans* que se han elaborado en Europa (1) (2) (3) y en América del Norte (4) (5) (6) (7) (8) y se han sometido a ensayos interlaboratorios (1) (6) (9). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien documentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. La situación de exposición aplicada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema. La selección de la situación de exposición adecuada depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. La situación de enriquecimiento del sedimento tiene el objetivo de simular niveles acumulados de sustancias que permanecen en el sedimento. Este sistema de exposición implica el enriquecimiento del sedimento de un sistema de ensayo sedimento-agua.

3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos períodos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición, y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con log K_{ow} > 5) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema. Para tener en cuenta todas las vías potenciales de exposición, el presente método de ensayo insiste en la exposición a largo plazo. La duración del ensayo está en la banda de 20 a 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 28 a 65 días en el de *C. tentans*. Si se necesitan datos a un plazo más corto con algún fin específico como, por ejemplo, investigar los efectos de una sustancia inestable, es posible retirar réplicas adicionales tras un plazo de diez días.

4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen y el tiempo transcurrido hasta su aparición. Se recomienda que las mediciones de supervivencia y crecimiento de las larvas no se hagan hasta que hayan pasado diez días si se necesitan datos adicionales a corto plazo, utilizando réplicas adicionales cuando convenga.

5. Se recomienda el uso de sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:

   — se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una "matriz normalizada" reproducible y desaparece la necesidad de conseguir fuentes de sedimentos limpios y no contaminados,

   — pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena; el uso de un sedimento artificial reduce también el coste asociado con la recogida de campo de cantidades suficientes de sedimentos para los ensayos sistemáticos,

   — el uso de sedimento artificial permite comparar la toxicidad de las sustancias y clasificarlas en consecuencia.

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

▼M4

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de primer estadio larvario a una serie de concentraciones de la sustancia problema en sistemas sedimento-agua. La sustancia problema se introduce en el sedimento y a continuación se toman larvas del primer estadio y se ponen en vasos donde se han estabilizado diferentes concentraciones de sedimento y agua. Al final del ensayo se mide la tasa de aparición de adultos y de desarrollo de quironómidos. También es posible medir la supervivencia y el peso de las larvas a los 10 días en caso necesario, utilizando réplicas adicionales cuando proceda. Estos datos se analizan o bien usando un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en la aparición de adultos o en la supervivencia o el crecimiento de las larvas (por ejemplo, EC_{15}, EC_{50}, etc.), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la NOEC/LOEC. Esta última posibilidad exige la comparación de valores de efectos con valores que tienen control, utilizando pruebas estadísticas.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya precisión y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También es útil la información sobre el destino químico de la sustancia problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia 12 se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Puede realizarse periódicamente un ensayo con sustancias de referencia, para asegurarse de la fiabilidad del protocolo y de las condiciones del ensayo. Las siguientes sustancias son ejemplos de tóxicos de referencia utilizados con éxito en estudios interlaboratorios y de validación: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la aparición de adultos en los controles no ha de ser inferior al 70 % al final del ensayo (1) (6),

— la aparición de adultos de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* en los recipientes de control debe producirse cuando hayan transcurrido entre 12 y 23 días desde su introducción en los recipientes; en el caso de *C. tentans* es necesario un plazo de entre 20 y 65 días,

— al final del ensayo deben medirse en cada recipiente el pH y la concentración de oxígeno disuelto; la concentración de oxígeno debe ser al menos el 60 % del valor de saturación en el aire a la temperatura aplicada, y el pH del agua sobrenadante debe estar en el rango de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo,

— la temperatura del agua no debe variar en más de ± 1,0 °C; la temperatura del agua podría controlarse mediante un espacio isotérmico y, en tal caso, debería confirmarse la temperatura ambiente de ese espacio a intervalos apropiados.

▼M4

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Recipientes de ensayo

11. El estudio se lleva a cabo en vasos de vidrio de 600 ml de capacidad y 8 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para que correspondan de 2 a 3 cm^2 por larva. La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con el sistema de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte como, por ejemplo, teflón.

Selección de la especie

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius.* También es adecuada la especie *Chironomus tentans,* pero resulta más difícil de manejar y requiere un período de ensayo más largo. Asimismo es posible utilizar *Chironomus yoshimatsui.* En el apéndice 2 se da información sobre los métodos de cultivo de *Chironomus riparius.* También se dispone de información sobre las condiciones de cultivo de otras especies, como *Chironomus tentans* (4) y *Chironomus yoshimatsui* (11). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

Sedimento

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono, pero es recomendable incluir otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los quironómidos o consumirlos. También se recomienda que el sedimento natural, antes de emplearse en un ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Se recomienda utilizar en este ensayo (1) (15) (16) el siguiente sedimento artificial, basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (14):

a) 4-5 % de turba (peso seco), de pH lo más próximo posible a la banda 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada solo al aire;

b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm;

d) agua desionizada añadida para obtener un contenido de humedad en la mezcla final el rango de 30 a 50 %;

e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a 7,0 ± 0,5; el contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % (± 0,5 %), ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, etc.). En el apéndice 3 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

▼M4

Agua

15. Es adecuada como agua de ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quironómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en $CaCO_3$. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

Soluciones madre — sedimentos enriquecidos

16. Los sedimentos enriquecidos a la concentración elegida se preparan por lo general añadiendo una solución de la sustancia problema directamente al sedimento. La solución madre de la sustancia problema preparada con agua desionizada se mezcla con el sedimento artificial mediante molino de rodillos, mezcladora de piensos o a mano. Si la sustancia problema es poco soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo). Esta solución se mezcla a continuación con 10 g de arena de cuarzo fina para un solo recipiente de ensayo. Se deja que se evapore el disolvente, que tiene que desaparecer totalmente de la arena; después se mezcla la arena con la cantidad adecuada de sedimento para un vaso de ensayo. Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia problema solo pueden utilizarse agentes que se volatilicen rápidamente. No ha de olvidarse que la arena aportada por la mezcla de sustancia problema y arena tiene que tenerse en cuenta a la hora de preparar el sedimento (es decir, el sedimento debe prepararse entonces con menos arena). Debe velarse por que la sustancia problema añadida al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento. En caso necesario, deben analizarse submuestras para determinar el grado de homogeneidad.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de larvas por recipiente. Se describen los diseños para la estimación puntual de la EC y de la NOEC, así como para realizar un ensayo límite.

Diseño para análisis de regresión

18. La concentración con efecto (por ejemplo, EC_{15}, EC_{50}) y el rango de concentraciones en la que resulta interesante el efecto de la sustancia problema, tienen que estar abarcadas entre las concentraciones incluidas en el ensayo. En general, la exactitud y, sobre todo, la validez con la que pueden hacerse las estimaciones de las concentraciones con efecto (EC_x) mejoran cuando la concentración con efecto se encuentra dentro del rango de concentraciones ensayadas. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la menor concentración positiva o por encima de la concentración máxima. Es conveniente efectuar previamente un ensayo para seleccionar el rango de concentraciones que se deba utilizar (véase el punto 27).

▼M4

19. Si ha de estimarse la EC_x, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y tres réplicas por cada concentración. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no sebe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con diferentes respuestas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo. Si se han de estimar la supervivencia y el crecimiento de las larvas a los 10 días, es necesario emplear réplicas adicionales.

Diseño para estimar una NOEC/LOEC

20. Si hay que estimar la LOEC y/o la NOEC, se deben emplear cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($p = 0,05$). Respecto a la tasa de desarrollo, suele ser adecuado un análisis de la varianza (ANOVA), como el ensayo de Dunnett o el de Williams (17) (18) (19) (20). Para la tasa de aparición, pueden emplearse el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel.

Ensayo límite

21. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y un control) si no se han observado efectos en el ensayo previamente efectuado para seleccionar el rango de concentraciones. La finalidad del ensayo límite es someter a ensayo una concentración suficientemente elevada como para permitir a los responsables excluir cualquier efecto tóxico de la sustancia problema, y el límite se establece a una concentración que no se espera encontrar en la realidad en ninguna situación. Se recomienda la concentración de 1 000 mg/kg (peso seco). Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($p = 0,05$). Con una respuesta métrica (tasa de desarrollo y peso), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, tal como la de Wilcoxon-Mann-Whithey. En relación con la tasa de aparición de adultos es adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

Condiciones de exposición

Preparación del sistema sedimento enriquecido-agua

22. El procedimiento de enriquecimiento descrito en el método de ensayo C.8. Toxicidad para gusanos de tierra es el recomendado para su aplicación a la sustancia problema (14). Los sedimentos enriquecidos se colocan en los recipientes y se añade agua sobrenadante para conseguir una relación de volumen sedimento-agua de 1:4 (véanse los puntos 11 y 15). La altura de la capa de sedimento debe estar entre 1,5 y 3 cm. Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, puede cubrirse el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.

23. Los recipientes de ensayo tienen que estar cubiertos (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario, manténgase durante el estudio el volumen de agua inicial añadiendo agua para compensar la evaporación de esta. Para esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada a fin de evitar la formación de sales.

▼M4

Estabilización

24. Una vez preparado el sedimento enriquecido con el agua sobrenadante, es conveniente dejar que la sustancia problema se reparta pasando de la fase acuosa al sedimento (3) (4) (6) (13). Esto debe efectuarse de preferencia en las mismas condiciones de temperatura y aireación que el ensayo. El tiempo adecuado para el equilibrado depende de la sustancia y del sedimento, y puede ser del orden de horas o de días, aunque en ciertos casos raros puede llegar a ser de varias semanas (4 o 5 semanas). Como esto daría ocasión para la degradación de muchas sustancias, no se espera hasta alcanzar el equilibrio completo, sino que se recomienda un período de equilibrado de 48 h. Al final de este período de equilibrado, debe medirse la concentración de la sustancia problema en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, al menos a la concentración más elevada y a una inferior (véase el punto 38). Estas determinaciones analíticas de la sustancia problema permiten el cálculo del balance de masas y la expresión de los resultados sobre la base de las concentraciones medidas.

Adición de los organismos de ensayo

25. Cuatro o cinco días antes de añadir los organismos de ensayo a los recipientes de ensayo, deben tomarse de los cultivos masas de huevos y ponerlas en recipientes pequeños con medio de cultivo. Puede utilizarse medio viejo del cultivo madre o medio recién preparado. Si se utiliza este último, debe añadírsele una pequeña cantidad de alimento como, por ejemplo, algas verdes o unas gotitas de filtrado de una suspensión finamente molida de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a salir de los huevos un par de días después de la puesta (de 2 a 3 días en el caso de *Chironomus riparius* a 20 °C y de 1 a 4 días en el de *Chironomus tentans* a 23 °C y en el de *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) y el crecimiento de las larvas tiene lugar en cuatro fases, cada una de entre 4 y 8 días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas de primera fase (2-3 o 1-4 días tras la eclosión). La fase de los animales puede comprobarse midiendo la anchura de la cápsula cefálica (6).

26. Se asignan aleatoriamente veinte larvas de primera fase a cada recipiente de ensayo que contenga el sedimento enriquecido y el agua, utilizando una pipeta de punta roma. Es necesario detener la aireación del agua mientras se ponen las larvas en los recipientes de ensayo y mantener la situación durante otras 24 horas tras la adición de las larvas (véanse los puntos 25 y 32). Según el diseño de ensayo empleado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es de al menos 60 para la estimación puntual de la ECx y de 80 para la determinación de la NOEC.

Concentraciones de ensayo

27. Puede ser útil efectuar un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. A fin de proporcionar la misma densidad superficial por quironómido que se vaya a emplear para el ensayo definitivo, se exponen los quironómidos a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas, y no hace falta utilizar réplicas.

28. Las concentraciones de ensayo para el ensayo definitivo se deciden sobre la base del resultado del ensayo de determinación del rango de concentraciones. Deben utilizarse al menos cinco concentraciones y seleccionarse como se describe en los puntos 18 a 20.

▼M4

Controles

29. Deben incluirse en el ensayo, con el número adecuado de réplicas, recipientes de control sin sustancia problema pero con sedimento (véanse los puntos 19-20). Si se ha utilizado algún disolvente para aplicar la sustancia problema (véase el punto 16), debe añadirse un control del disolvente en el sedimento.

Sistema de ensayo

30. Se emplean sistemas estáticos. Pueden utilizarse en casos excepcionales sistemas semiestáticos o dinámicos con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, como, por ejemplo, si las especificaciones de calidad del agua se hacen inadecuadas para el organismo de ensayo o afectan al equilibrio químico (por ejemplo, cuando los niveles de oxígeno disuelto caen demasiado, la concentración de excrementos se eleva demasiado, o se lixivian minerales del sedimento con modificación del pH y/o de la dureza del agua). Sin embargo, normalmente será suficiente y preferible emplear otros métodos de mejora de la calidad del agua sobrenadante, como la aireación.

Alimentación

31. Es necesario alimentar a las larvas, de preferencia una vez al día o, al menos, tres veces por semana. Parece adecuada una ración diaria de comida para peces (suspensión en agua o comida finamente molida como, por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll; véanse detalles en el apéndice 2), de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg para *C. yoshimatsui*) por larva durante los 10 primeros días. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controles si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo. Cuando se someten a ensayo sustancias muy adsorbentes (por ejemplo, con log K_{ow} > 5), o hay sustancias que se unen covalentemente al sedimento, es posible añadir al sedimento artificial, antes del período de estabilización, la cantidad de comida necesaria para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de los organismos. Con este objetivo, debe utilizarse material vegetal en lugar de la comida para peces, por ejemplo, adición de 0,5 % (peso seco) de hojas finamente molidas de ortiga mayor (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o alfa-celulosa).

Condiciones de incubación

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo, preferentemente a las 24 h de la adición de las larvas, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del valor de saturación en el aire). La aireación se aporta mediante una pipeta Pasteur de vidrio fijada a 2-3 cm por encima del nivel del sedimento, con el ritmo de una o unas pocas burbujas por segundo. Cuando se sometan a ensayo sustancias volátiles, debe considerarse el no airear el sistema sedimento-agua.

33. El ensayo se efectúa a la temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. tentans* y de *C. yoshimastsui,* las temperaturas recomendadas son de 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperíodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux.

▼M4

Duración de la exposición

34. La exposición comienza con la adición de larvas a los recipientes con sedimento enriquecido y a los de control. La duración máxima del ensayo es de 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 65 días en el de *C. tentans.* Si los dípteros aparecen antes, es posible terminar el ensayo tras un mínimo de cinco días desde la aparición del último adulto en los recipientes de control.

Observaciones

Aparición de adultos

35. Se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras que aparecen completamente. Los machos se identifican fácilmente por sus antenas plumosas.

36. Hay que observar los recipientes de ensayo al menos tres veces por semana para hacer una evaluación visual de los eventuales comportamientos anormales (por ejemplo, dejar el sedimento, nadar de forma inusual) respecto al control. Durante el tiempo en que se prevea que ha de ocurrir la aparición es necesario efectuar un recuento diario de los dípteros aparecidos. Se registran cada día el sexo y el número de los dípteros aparecidos completamente. Tras su identificación, se sacan los dípteros de los recipientes. Las eventuales masas de huevos puestas antes de la terminación del ensayo deben anotarse y después retirarse para evitar la reintroducción de larvas en el sedimento. También debe registrarse el número de pupas visibles de las que no han llegado a aparecer adultos. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre la medición de la aparición de los dípteros.

Crecimiento y supervivencia

37. Si han de proporcionarse datos sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas a los 10 días, deben incluirse desde el principio recipientes de ensayo adicionales, de forma que puedan utilizarse después. El sedimento de estos recipientes adicionales se filtra a través de un tamiz de 250 μm para retener las larvas. Los criterios para determinar la muerte son la inmovilidad o la ausencia de reacción ante un estímulo mecánico. Las larvas no recuperadas deben contarse asimismo como muertas (las larvas que hayan muerto al inicio del ensayo pueden haber sido degradadas por los microbios). Se determina el peso seco (libre de cenizas) de las larvas supervivientes por recipiente de ensayo y se calcula el peso seco individual medio por recipiente. Es útil determinar a qué fase pertenecen las larvas supervivientes; para obtener este dato puede utilizarse la medición de la anchura de la cápsula cefálica de cada individuo.

Mediciones analíticas

Concentración de la sustancia problema

38. Antes de iniciar el ensayo (es decir, la adición de las larvas), se toman muestras de sedimento de al menos un recipiente por tratamiento para la determinación analítica de la concentración de la sustancia problema en el sedimento. Se recomienda que, como mínimo, se analicen muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio (véase el punto 24) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema informan sobre el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento.

39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día nº 7) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin influir en el sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.

▼M4

40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo a 10 000 g y 4 °C durante 30 min. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

Parámetros fisicoquímicos

41. Deben medirse de la manera adecuada el pH y la temperatura de los recipientes de ensayo (véase el punto 10). Hay que medir la dureza y el amoníaco en los controles y en un recipiente de ensayo a la concentración máxima, al inicio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

42. El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia completamente sobre la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras totalmente aparecidos o, en el caso de los efectos del ensayo de 10 días, sobre la supervivencia y el peso de las larvas. Si no hay ninguna señal de sensibilidades estadísticamente diferentes según los sexos, a efectos de análisis estadísticos pueden agruparse los resultados de machos y de hembras. Las diferencias de sensibilidad entre los sexos pueden evaluarse estadísticamente mediante, por ejemplo, una prueba de tabla de contingencia de χ^2-r × 2. Cuando así se requiera, habrá que determinar la supervivencia de las larvas y su peso seco individual medio por recipiente al cabo de 10 días.

43. Las concentraciones que tienen efecto, expresadas en peso seco y sobre la base de este, se calculan preferentemente a partir de las concentraciones medidas en el sedimento al inicio del ensayo (véase el punto 38).

44. A efectos de computar una estimación puntual para la EC_{50} o cualquier otra EC_x, las estadísticas por recipiente pueden utilizarse como réplicas verdaderas. Al calcular el intervalo de confianza para cualquier EC_x, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que mostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación estadística por cada recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de EC_x deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original.

45. Cuando el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC mediante contrastes de hipótesis, es necesario tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, por ejemplo mediante un análisis de varianza anidado. También puede ser adecuado realizar ensayos más robustos (21) en situaciones en que no se cumplen las hipótesis de los análisis de varianza usuales.

Tasa de aparición

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados por el método de Cochran-Armitage aplicado con ajuste secuencial de residuos cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o el método de Mantel-Haenszel con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas dentro de la misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se señala generalmente como variación "extrabinomial"), hay que utilizar un método de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher robustos (como se propone en el punto 21).

▼**M4**

Se determina la suma de dípteros aparecidos por recipiente, n_e, y se divide por el número de larvas introducidas, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

donde:

ER = tasa de aparición

n_e = número de dípteros aparecidos por recipiente

n_a = número de larvas introducidas por recipiente

47. Otra posibilidad más adecuada para las muestras de gran tamaño, cuando hay variación extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y emplear procedimientos tales como la prueba de Williams cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y es coherente con estos datos de tasa de aparición. La prueba de Dunnett sería apropiada si no se mantuviera la monotonía. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros emergidos como el número de no emergidos es superior a cinco, por réplica (recipiente).

48. Para aplicar los métodos de análisis de la varianza, hay que transformar primero los valores de tasa de aparición mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Freeman-Tukey para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando el arcoseno (sen^{-1}) de la raíz cuadrada de la tasa de aparición.

49. Respecto a las tasas de aparición, los valores de EC_x se calculan mediante análisis de regresión [o, por ejemplo, probit (22), logit, Weibull, programas comerciales apropiados, etc.]. Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple).

Tasa de desarrollo

50. El tiempo de desarrollo medio corresponde al intervalo medio de tiempo entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para el cálculo del tiempo de desarrollo verdadero debe tenerse en cuenta la edad de las larvas en el momento de su introducción). La tasa de desarrollo es la inversa del tiempo de desarrollo (unidades: 1/día) y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal que el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos más potentes con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando a la tasa de desarrollo como respuesta continua, es possible estimar valores de EC_x mediante análisis de regresión [por ejemplo, (23), (24)].

51. En relación con las siguientes pruebas estadísticas, se supone que el número de dípteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día x - l (l = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente (x) se calcula con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

donde:

$\bar{x}$: tasa de desarrollo media por recipiente,

i: índice del intervalo de inspección,

m: número máximo de intervalos de inspección,

f_i: número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i,

n_e: número total de dípteros aparecidos al final del experimento ($= \sum f_i$),

x_i: tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i,

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

donde:

day_i: día de inspección (días desde la aplicación),

l_i: longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día).

Informe del ensayo

52. El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia problema:

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), estabilidad en el agua, etc.).

— Datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

Especie de ensayo:

— Animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.

— Información sobre la manipulación de las masas de huevos y de las larvas.

— Edad de los animales de ensayo cuando se introducen en los recipientes de ensayo.

Condiciones de ensayo:

— Sedimento utilizado, es decir, si es natural o artificial.

— En el caso del sedimento natural, ubicación y descripción del lugar de muestreo del sedimento, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación; características: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (cuando sea apropiado).

— Preparación del sedimento artificial: ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., al inicio del ensayo).

— Preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, etc., al inicio del ensayo).

— Altura del sedimento y del agua sobrenadante.

— Volumen del agua sobrenadante y del agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial.

▼M4

— Recipientes de ensayo (material y tamaño).

— Método para enriquecer el sedimento: concentraciones de ensayo utilizadas, número de réplicas y empleo eventual de disolvente.

— Fase de estabilización (equilibrado) del sistema sedimento enriquecido – agua: duración y condiciones.

— Condiciones de incubación: temperatura, intensidad y ciclo de luz, aireación (frecuencia e intensidad).

— Información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

Resultados:

— Concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo.

— Calidad del agua de los recipientes de ensayo, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco.

— Sustitución del agua de ensayo evaporada, en su caso.

— Número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día.

— Número de larvas que no han aparecido como dípteros por recipiente.

— Peso seco individual medio de las larvas por recipiente, y por fase, en caso apropiado.

— Porcentaje de apariciones por réplica y concentración de ensayo (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Tasa de desarrollo media de los dípteros aparecidos completamente por réplica y tasa de tratamiento (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, EC_x (con intervalos de confianza asociados), NOEC y/o LOEC, y métodos estadísticos empleados para su determinación.

— Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Método de ensayo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIONES

A efectos del presente método de ensayo, aplicarán las siguientes definiciones:

Sedimento artificial (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): una mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

Agua sobrenadante: el agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

Agua intersticial: el agua que ocupa el espacio entre el sedimento y las partículas del suelo.

Sedimento enriquecido: el sedimento al que se ha añadido sustancia problema.

Sustancia problema: toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M4

Apéndice 2

Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius*

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también constituye un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse rellenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos que aparezcan. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).

2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

Agua de dilución

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo desclorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de emplearla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo, sin destruir los tubos de las larvas.

Alimentación de las larvas

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), al ritmo de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Esta preparación puede administrarse al ritmo de unos 5 ml por recipiente al día y ha de agitarse antes de usarse. Las larvas más viejas pueden recibir más cantidad.

5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Es necesario supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.

6. Es posible añadir también algunas células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) cuando se establecen recipientes de cultivo nuevos.

Alimentación de los adultos aparecidos

7. Algunos experimentadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos aparecidos.

▼M4

Aparición de adultos

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas a los 13-15 días aproximadamente. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas.

Masas de huevos

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse cuidadosamente y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para iniciar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, 2-4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.

10. Las larvas en primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 – 3 días.

Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos de cultivo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

Preparación de las soluciones de ensayo M4 y M7

12. Elendt (1990) describió el medio M4. El M7 se prepara como el medio M4, salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en el cuadro 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio M7 que en el M4. Se está preparando una publicación sobre el medio M7 (Elendt, comunicación personal). La solución de ensayo no debe prepararse siguiendo a Elendt y Bias (1990), ya que no son adecuadas las concentraciones de $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 y K_2HPO_4 dadas para la preparación de las soluciones madre.

Preparación del medio M7

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase el cuadro 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que se dan en el cuadro 2 y se llevan a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio M7. Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas a agua desionizada como se indica en el cuadro 3, y se añaden al medio M7 final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo (la solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas). El medio se airea y se estabiliza.

BIBLIOGRAFÍA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius:* Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Cuadro 1

Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7

Soluciones madre (I)	Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada	Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada		Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.
(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

Cuadro 2

Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Cuadro 3

Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7. Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitaminas

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
Clorhidrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFÍA:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna. Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apéndice 3

PREPARACIÓN DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL

Composición del sedimento

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

Componente	Características	% de sedimento en peso seco
Turba	Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire	4 - 5
Arena de cuarzo	Granulometría: > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 µm	75 - 76
Caolín	Contenido en caolinita ≥ 30 %	20
Carbono orgánico	Ajustado mediante adición de turba y arena	2 (± 0,5)
Carbonato de calcio	$CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro	0,05 - 0,1
Agua	Conductividad ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Preparación

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a 6,0 ± 0,5. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30-50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido en carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

Almacenamiento

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

BIBLIOGRAFÍA:

Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Apéndice 4

Características químicas aceptables del agua de dilución

Sustancia	Concentraciones
Materia en partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoníaco no ionizado	< 1 µg/l
Dureza expresada en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

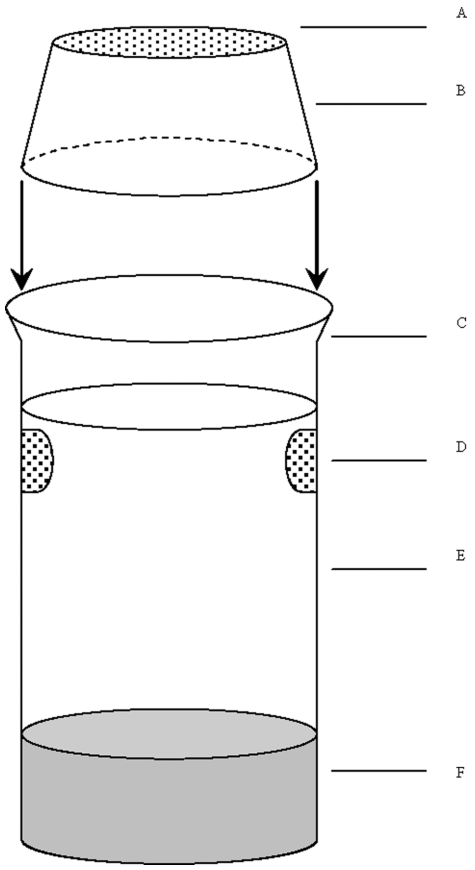
(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

▼M4

Apéndice 5

Orientaciones para el seguimiento de la aparición de las larvas de quironómidos

Se ponen trampas de aparición en los vasos del ensayo. Estas trampas tienen que mantenerse desde el día 20 hasta el final del ensayo. A continuación figura el esquema de un ejemplo de trampa:



A: tamiz de nailon

B: tazas de plástico invertidas

C: vaso de exposición sin pico

D: accesos con tamiz para intercambio de agua

E: agua

F: sedimento

▼M4

C. 28. **ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTOS-AGUA CON AGUA ENRIQUECIDA**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 219 (2004). El presente método de ensayo está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada de sustancias sobre las larvas del díptero de agua dulce *Chironomus* sp., que viven en los sedimentos. Se basa principalmente en las directrices del BBA, que utiliza un sistema de ensayo sedimento-agua con suelo artificial, y una situación de exposición en la columna de agua (1). También tiene en cuenta los actuales protocolos de ensayo de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus tentans* que se han elaborado en Europa y en América del Norte (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) y se han sometido a ensayos interlaboratorios (1) (6) (9). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien decumentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. La situación de exposición empleada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del agua. La selección de la situación de exposición adecuada depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. La situación de exposición en agua, que implica el enriquecimiento de la columna de agua, pretende simular un caso de aerosol errático de un plaguicida y comprende el pico inicial de concentraciones en el agua intersticial. También es útil para otros tipos de exposición (incluidos los vertidos de sustancias), salvo los procesos de acumulación que duren más que el período de ensayo.

3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos plazos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición, y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con log K_{ow} > 5) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema. Para tener en cuenta todas las vías potenciales de exposición, el presente método de ensayo insiste en la exposición a largo plazo. La duración del ensayo está en la banda de 20 a 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 28 a 65 días en el de *C. tentans*. Si se necesitan datos a un plazo más corto con algún fin específico como, por ejemplo, para investigar los efectos de sustancias inestables, es posible retirar réplicas paralelas adicionales tras un plazo de diez días.

4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen y el tiempo transcurrido hasta la aparición. Se recomienda que las mediciones de supervivencia y crecimiento de las larvas no se hagan hasta que hayan pasado diez días si se necesitan datos adicionales a corto plazo, utilizando réplicas adicionales cuando convenga.

5. Se recomienda el uso de sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:

— se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una "matriz normalizada" reproducible y desaparece la necesidad de conseguir fuentes de sedimentos limpios y no contaminados,

— pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena; el uso de un sedimento artificial reduce también el coste asociado con la recogida de campo de cantidades suficientes de sedimentos para los ensayos sistemáticos,

▼M4

— el uso de sedimento artificial permite comparar la toxicidad de las sustancias y clasificarlas en consecuencia: son comparables los datos de toxicidad obtenidos de ensayos realizados con sedimentos naturales y artificiales en relación con diversas sustancias (2).

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de la primera fase del estado larvario a una serie de concentraciones de la sustancia problema en sistemas sedimento-agua. El ensayo se inicia poniendo larvas de primer estadio en vasos de ensayo que contienen el sistema sedimento-agua y a continuación se añade al agua la sustancia problema. Al final del ensayo se mide la tasa de aparición y de desarrollo de quironómidos. También es posible medir la supervivencia y el peso de las larvas a los 10 días en caso necesario, utilizando réplicas adicionales cuando proceda. Estos datos se analizan o bien usando un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en la aparición o en la supervivencia o el crecimiento de las larvas (por ejemplo, EC_{15}, EC_{50}, etc.), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la NOEC/LOEC. Esta última posibilidad exige la comparación de valores que tienen efectos con valores de control, utilizando pruebas estadísticas.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya precisión y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También es útil la información sobre el destino químico de la sustancia problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia 12 se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Puede realizarse periódicamente un ensayo con sustancias de referencia, para asegurarse de la fiabilidad del protocolo y de las condiciones del ensayo. Las siguientes sustancias son ejemplos de tóxicos de referencia utilizados con éxito en estudios interlaboratorios y de validación: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la aparición de adultos en los controles no ha de ser inferior al 70 % al final del ensayo (1) (6),

— la aparición de adultos de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* en los recipientes de control debe producirse cuando hayan transcurrido entre 12 y 23 días desde su introducción en los recipientes; en el caso de *C. tentans* es necesario un plazo de entre 20 y 65 días,

— al final del ensayo deben medirse en cada recipiente el pH y la concentración de oxígeno disuelto; la concentración de oxígeno debe ser al menos el 60 % del valor de saturación en el aire a la temperatura aplicada, y el pH del agua sobrenadante debe estar en el rango de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo,

▼M4

— la temperatura del agua no debe variar en más de ± 1,0 °C; la temperatura del agua podría controlarse mediante un espacio isotérmico y, en tal caso, debería confirmarse la temperatura ambiente de ese espacio a intervalos apropiados.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Recipientes de ensayo

11. El estudio se lleva a cabo en vasos de vidrio de 600 ml de capacidad y 8 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para que correspondan de 2 a 3 cm^2 por larva. La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con el sistema de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte como, por ejemplo, teflón.

Selección de las especies

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius.* También es adecuada la especie *Chironomus tentans,* pero resulta más difícil de manejar y requiere un período de ensayo más largo. Asimismo es posible utilizar *Chironomus yohimatsui.* En el apéndice 2 se da información sobre los métodos de cultivo de *Chironomus riparius.* También se dispone de información sobre las condiciones de cultivo de otras especies, como *Chironomus tentans* (4) y *Chironomus yoshimatsui* (11). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

Sedimento

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono, pero es recomendable incluir otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los quironómidos o consumirlos. También se recomienda que el sedimento natural, antes de emplearse en un ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Se recomienda utilizar en este ensayo (1) (15) (16) el siguiente sedimento artificial, basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (14):

a) 4-5 % de turba (peso seco): de pH lo más próximo posible a la banda 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada solo al aire;

b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm;

d) agua desionizada para obtener un contenido de humedad en la mezcla final en el rango de 30 a 50 %;

e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a 7,0 ± 0,5;

f) el contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % (± 0,5 %), ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

▼M4

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, etc.). En el apéndice 3 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

Agua

15. Es adecuada como agua para el ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quironómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en $CaCO_3$. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

Soluciones madre — agua enriquecida

16. Las concentraciones de ensayo se calculan a partir de las concentraciones en la columna de agua, es decir, en el agua sobrenadante, que recubre al sedimento. Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. A ser posible, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia en medio de ensayo. En algunos casos puede ser necesario utilizar disolventes o dispersantes para obtener una solución madre a la concentración deseada. Como ejemplos de disolventes adecuados pueden darse los siguientes: etanol, metanol, éter monometílico de etilenglicol, éter dimetílico de etilenglicol, dimetilformamida y trietilenglicol. Los dispersantes utilizables son Cremaphor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCO-40. La concentración del agente solubilizante en el medio de ensayo final debe ser mínima (es decir, $\leq$ 0,1 ml/l) y la misma en todos los tratamientos. Si se emplea un agente solubilizante, no debe actuar de forma significativa sobre la supervivencia ni producir efectos nocivos visibles sobre las larvas de quironómidos, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo lleve disolvente. No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de larvas por recipiente. Se describen los diseños para la estimación puntual de la EC y de la NOEC, así como para realizar un ensayo límite. Es preferible el análisis de regresión antes que el planteamiento de contrastes de hipótesis.

Diseño para análisis de regresión

18. La concentración con efecto (por ejemplo, EC_{15}, EC_{50}) y el rango de concentraciones en la que resulta interesante el efecto de la sustancia problema, tienen que estar abarcadas entre las concentraciones incluidas en el ensayo. En general, la exactitud y, sobre todo, la validez con la que pueden hacerse las estimaciones de las concentraciones con efecto (EC_x) mejoran cuando la

▼M4

concentración con efecto se encuentra dentro del rango de concentraciones ensayadas. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la menor concentración positiva o por encima de la concentración máxima. Es conveniente efectuar previamente un ensayo para seleccionar el rango de concentraciones que se deba utilizar (véase el punto 27).

19. Si ha de estimarse la EC_x, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y tres réplicas por cada concentración. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no sebe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con diferentes respuestas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo. Si se han de estimar la supervivencia y el crecimiento de las larvas a los 10 días, es necesario emplear réplicas adicionales.

Diseño para estimar una NOEC/LOEC

20. Si hay que estimar la LOEC y/o la NOEC, se deben emplear cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % (p = 0,05). Respecto a la tasa de desarrollo, suele ser adecuado un análisis de la varianza (ANOVA), como el ensayo de Dunnett o el de Williams (17) (18) (19) (20). Para la tasa de aparición, pueden emplearse el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel.

Ensayo límite

21. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y un control) si no se han observado efectos en el ensayo previamente efectuado para seleccionar la banda de concentraciones. El objetivo del ensayo límite es indicar que el valor tóxico de la sustancia problema es superior a la concentración límite estudiada. No es posible formular en el presente método de ensayo ninguna sugerencia de concentración recomendada; queda al criterio de las autoridades reguladoras. Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % (p = 0,05). Con una respuesta métrica (tasa de desarrollo y peso), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, tal como la de Wilcoxon-Mann-Whithey. En relación con la tasa de aparición de adultos es adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

Condiciones de exposición

Preparación del sistema agua enriquecida-sedimento

22. Se añaden a los recipientes de ensayo cantidades adecuadas del sedimento artificial (véanse los puntos 13-14 y el apéndice 3) para formar una capa de al menos 1,5 cm. Se añade agua hasta una altura de 6 cm (véase el punto 15). La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua no debe ser mayor que 1:4, y la capa de sedimento no debe tener una altura mayor que 3 cm. El sistema sedimento-agua debe dejarse con aireación suave durante siete días antes de que se añadan los organismos de ensayo (véanse el punto 14 y el apéndice 3). Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, puede cubrirse el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.

▼M4

23. Los recipientes de ensayo tienen que estar cubiertos (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario, manténgase durante el estudio el volumen de agua inicial añadiendo agua para compensar la evaporación de esta. Para esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada para evitar la formación de sales.

Adición de los organismos de ensayo

24. Cuatro o cinco días antes de añadir los organismos de ensayo a los recipientes de ensayo, deben tomarse de los cultivos masas de huevos y ponerlas en recipientes pequeños con medio de cultivo. Puede utilizarse medio viejo del cultivo madre o medio recién preparado. Si se utiliza este último, debe añadírsele una pequeña cantidad de alimento como, por ejemplo, algas verdes o unas gotitas de filtrado de una suspensión finamente molida de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a salir de los huevos un par de días después de la puesta (de 2 a 3 días en el caso de *Chironomus riparius* a 20 °C y de 1 a 4 días en el de *Chironomus tentans* a 23 °C y en el de *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) y el crecimiento de las larvas tiene lugar en cuatro fases, cada una de entre 4 y 8 días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas de la primera fase (2-3 o 1-4 días tras la eclosión). La fase de los animales puede comprobarse midiendo la anchura de la cápsula cefálica (6).

25. Se asignan aleatoriamente veinte larvas de primera fase a cada recipiente de ensayo que contenga el sedimento enriquecido y el agua, utilizando una pipeta de punta roma. Es necesario detener la aireación del agua mientras se ponen las larvas en los recipientes de ensayo y mantener la situación durante otras 24 horas tras la adición de las larvas (véanse los puntos 24 y 32). Según el diseño de ensayo empleado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es de al menos 60 para la estimación puntual de la EC y de 80 para la determinación de la NOEC.

26. A las veinticuatro horas de haber añadido las larvas, se pone la sustancia problema en la columna de agua sobrenadante, y se vuelve a aportar aireación leve. Utilizando una pipeta, se aplican pequeños volúmenes de las soluciones de la sustancia problema por debajo de la superficie del agua. A continuación debe mezclarse el agua sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento.

Concentraciones de ensayo

27. Puede ser útil efectuar un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. A fin de proporcionar la misma densidad superficial por quironómido que se vaya a emplear para el ensayo definitivo, se exponen los quironómidos a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas, y no hace falta utilizar réplicas.

28. Las concentraciones de ensayo para el ensayo definitivo se deciden sobre la base del resultado del ensayo de determinación del rango de concentraciones. Deben utilizarse al menos cinco concentraciones y seleccionarse como se describe en los puntos 18 a 20.

Controles

29. Deben incluirse en el ensayo, con el número adecuado de réplicas, recipientes de control sin sustancia problema pero con sedimento (véanse los puntos 19-20). Si se ha utilizado algún disolvente para aplicar la sustancia problema (véase el punto 16), debe añadirse un control del disolvente en el sedimento.

▼M4

Sistema de ensayo

30. Se emplean sistemas estáticos. Pueden utilizarse en casos excepcionales sistemas semiestáticos o dinámicos con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, como, por ejemplo, si las especificaciones de calidad del agua se hacen inadecuadas para el organismo de ensayo o afectan al equilibrio químico (por ejemplo, cuando los niveles de oxígeno disuelto caen demasiado, la concentración de excrementos se eleva demasiado, o se lixivian minerales del sedimento con modificación del pH y/o de la dureza del agua). Sin embargo, normalmente será suficiente y preferible emplear otros métodos de mejora de la calidad del agua sobrenadante, como la aireación.

Alimentación

31. Es necesario alimentar a las larvas, de preferencia una vez al día o, al menos, tres veces por semana. Parece adecuada una ración diaria de comida para peces (suspensión en agua o comida finamente molida como, por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll; véanse detalles en el apéndice 2), de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg para *C. yoshimatsui*) por larva durante los 10 primeros días. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controlarse si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo. Cuando se someten a ensayo sustancias muy adsorbentes (por ejemplo, con log K_{ow} > 5), o hay sustancias que se unen covalentemente al sedimento, es posible añadir al sedimento artificial, antes del período de estabilización, la cantidad de comida necesaria para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de los organismos. Con este objetivo, debe utilizarse material vegetal en lugar de la comida para peces, por ejemplo, adición de 0,5 % (peso seco) de hojas finamente molidas de ortiga mayor (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o alfa-celulosa).

Condiciones de incubación

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo, preferentemente a las 24 h de la adición de las larvas, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del valor de saturación en el aire). La aireación se aporta mediante una pipeta Pasteur de vidrio fijada a 2-3 cm por encima del nivel del sedimento, con el ritmo de una o unas pocas burbujas por segundo. Cuando se sometan a ensayo sustancias volátiles, debe considerarse el no airear el sistema sedimento-agua.

33. El ensayo se efectúa a la temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. tentans* y de *C. yoshimatsui,* las temperaturas recomendadas son de 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperíodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux.

Duración de la exposición

34. La exposición comienza con la adición de larvas a los recipientes enriquecidos y a los de control. La duración máxima del ensayo es de 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 65 días en el de *C. tentans*. Si los dípteros aparecen antes, es posible terminar el ensayo tras un mínimo de cinco días desde la aparición del último adulto en los recipientes de control.

OBSERVACIONES

Aparición de adultos

35. Se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras que aparecen completamente. Los machos se identifican fácilmente por sus antenas plumosas.

▼M4

36. Hay que observar los recipientes de ensayo al menos tres veces por semana para hacer una evaluación visual de los eventuales comportamientos anormales (por ejemplo, dejar el sedimento, nadar de forma inusual) respecto al control. Durante el tiempo en que se prevea que ha de ocurrir la aparición es necesario efectuar un recuento diario de los dípteros aparecidos. Se registran cada día el sexo y el número de los dípteros aparecidos completamente. Tras su identificación, se sacan los dípteros de los recipientes. Las eventuales masas de huevos puestas antes de la terminación del ensayo deben anotarse y después retirarse para evitar la reintroducción de larvas en el sedimento. También debe registrarse el número de pupas visibles de las que no han llegado a aparecer adultos. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre la medición de la aparición de los dípteros.

Crecimiento y supervivencia

37. Si han de proporcionarse datos sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas a los 10 días, deben incluirse desde el principio recipientes de ensayo adicionales, de forma que puedan utilizarse después. El sedimento de estos recipientes adicionales se filtra a través de un tamiz de 250 μm para retener las larvas. Los criterios para determinar la muerte son la inmovilidad o la ausencia de reacción ante un estímulo mecánico. Las larvas no recuperadas deben contarse asimismo como muertas (las larvas que hayan muerto al inicio del ensayo pueden haber sido degradadas por los microbios). Se determina el peso seco (libre de cenizas) de las larvas supervivientes por recipiente de ensayo y se calcula el peso seco individual medio por recipiente. Es útil determinar a qué fase pertenecen las larvas supervivientes; para obtener este dato puede utilizarse la medición de la anchura de la cápsula cefálica de cada individuo.

Mediciones analíticas

Concentración de la sustancia problema

38. Como mínimo, deben analizarse muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio (preferentemente una hora tras la aplicación de la sustancia problema) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema informan sobre el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento. La toma de muestras del sedimento al inicio del ensayo puede influir en el sistema de ensayo (por ejemplo, eliminando larvas del ensayo), por lo que deberían emplearse recipientes de ensayo adicionales para realizar las determinaciones analíticas al inicio y durante el ensayo cuando sea apropiado (véase el punto 39). Puede no ser necesario efectuar mediciones en el sedimento si se ha determinado claramente el reparto de la sustancia problema entre el agua y el sedimento en un estudio agua/sedimento en condiciones comparables (por ejemplo, proporción entre sedimento y agua, tipo de aplicación, contenido en carbono orgánico del sedimento).

39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día nº 7) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin influir en el sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.

40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo a 10 000 g y 4 °C durante 30 min. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

▼M4

Parámetros fisicoquímicos

41. Deben medirse de la manera adecuada el pH, el oxígeno disuelto en el agua de ensayo y la temperatura de los recipientes de ensayo (véase el punto 10). Hay que medir la dureza y el amoníaco en los controles y en un recipiente de ensayo a la concentración máxima, al inicio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

42. El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia problema sobre la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras completamente aparecidos o, en el caso de los efectos del ensayo de 10 días, sobre la supervivencia y el peso de las larvas. Si no hay ninguna señal de sensibilidades estadísticamente diferentes según los sexos, pueden agruparse los resultados de machos y de hembras a efectos de análisis estadísticos. Las diferencias de sensibilidad entre los sexos pueden evaluarse estadísticamente mediante, por ejemplo, una prueba de tabla de contingencia de χ^2-r × 2 cuadro. Cuando así se requiera, habrá que determinar la supervivencia de las larvas y su peso seco individual medio por recipiente al cabo de 10 días.

43. Las concentraciones que tienen efecto, expresadas como concentraciones en el agua sobrenadante, se calculan preferentemente a partir de las concentraciones medidas al inicio del ensayo (véase el punto 38).

44. A efectos de computar una estimación puntual para la EC_{50} o cualquier otra EC_x, las estadísticas por recipiente pueden utilizarse como réplicas verdaderas. Al calcular el intervalo de confianza para cualquier EC_x, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que mostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación estádistica por cada recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de EC_x deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original.

45. Cuando el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC mediante contrastes de hipótesis, es necesario tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, por ejemplo mediante un análisis de varianza anidado. También puede ser adecuado realizar ensayos más robustos (21) en situaciones en que no se cumplen las hipótesis de los análisis de varianza usuales.

Tasa de aparición

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados por el método de Cochran-Armitage aplicado con ajuste secuencial de residuos cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o el método de Mantel-Haenszel con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas dentro de la misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se señala generalmente como variación "extrabinomial"), hay que utilizar un método de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher robustos (como se propone en el punto 21).

47. Se determina la suma de dípteros aparecidos por recipiente, n_e, y se divide por el número de larvas introducidas, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

donde:

ER = tasa de aparición

n_e = número de dípteros aparecidos por recipiente

n_a = número de larvas introducidas por recipiente

48. Otra posibilidad más adecuada para las muestras de gran tamaño, cuando hay variación extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y emplear procedimientos tales como la prueba de Williams cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y es coherente con estos datos de tasa de aparición. La prueba de Dunnett sería apropiada si no se mantuviera la monotonía. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros emergidos como el número de no emergidos es superior a cinco, por réplica (recipiente).

49. Para aplicar los métodos de análisis de la varianza, hay que transformar primero los valores de la tasa de aparición mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Freeman-Tukey para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni) o el método de Mantel-Haenszel. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando el arcoseno (sen^{-1}) de la raíz cuadrada de la tasa de aparición.

50. Respecto a las tasas de aparición, los valores de EC_x se calculan mediante análisis de regresión (o, por ejemplo, probit (22), logit, Weibull, programas comerciales apropiados, etc.). Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple).

Tasa de desarrollo

51. El tiempo medio de desarrollo corresponde al intervalo medio de tiempo entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para el cálculo del tiempo de desarrollo verdadero debe tenerse en cuenta la edad de las larvas en el momento de su introducción). La tasa de desarrollo es la inversa del tiempo de desarrollo (unidades: 1/día) y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal que el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos potentes más con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando la tasa de desarrollo como respuesta continua, es posible estimar valores de EC_x mediante análisis de regresión [por ejemplo, (23) (24)].

52. En relación con las siguientes pruebas estadísticas, se supone que el número de dipteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día x - l (l = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente (x) se calcula con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

donde:

$\bar{x}$: tasa de desarrollo media por recipiente,

i: índice del intervalo de inspección,

m: número máximo de intervalos de inspección,

▼M4

f_i: número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i,

n_e: número total de dípteros aparecidos al final del experimento (= $\sum f_i$),

x_i: tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i,

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

donde:

day_i: día de inspección (días desde la aplicación),

l_i: longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día).

Informe del ensayo

53. El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia problema:

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), estabilidad en el agua, etc.).

— Datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

Especie de ensayo:

— Animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.

— Información sobre la manipulación de las masas de huevos y de las larvas.

— Edad de los animales de ensayo cuando se introducen en los recipientes de ensayo.

Condiciones de ensayo:

— Sedimento utilizado, es decir, si es natural o artificial.

— En el caso del sedimento natural, ubicación y descripción del lugar de muestreo del sedimento, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación; características: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (cuando sea apropiado).

— Preparación del sedimento artificial: ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., al inicio del ensayo.

— Preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, etc., al inicio del ensayo).

— Altura del sedimento y del agua sobrenadante.

— Volumen del agua sobrenadante y del agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial.

— Recipientes de ensayo (material y tamaño).

— Método de preparación de soluciones madre y concentraciones de ensayo.

▼M4

— Aplicación de la sustancia problema: concentraciones de ensayo utilizadas, número de réplicas y empleo eventual de disolvente.

— Condiciones de incubación: temperatura, intensidad y ciclo de luz, aireación (frecuencia e intensidad).

— Información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

Resultados:

— Concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo.

— Calidad del agua de los recipientes de ensayo, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco.

— Sustitución del agua de ensayo evaporada, en su caso.

— Número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día.

— Número de larvas que no han aparecido como dípteros por recipiente.

— Peso seco individual medio de las larvas por recipiente, y por fase, en caso apropiado.

— Porcentaje de apariciones por réplica y concentración de ensayo (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Tasa de desarrollo media de los dípteros aparecidos completamente por réplica y tasa de tratamiento (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, EC_x (con intervalos de confianza asociados), NOEC y/o LOEC, y métodos estadísticos empleados para su determinación.

— Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Apéndice 1

DEFINICIONES

A efectos del presente método, se aplicarán las siguientes definiciones por:

Sedimento artificial (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

Agua sobrenadante: el agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

Agua intersticial: el agua que ocupa el espacio entre el sedimento y las partículas del suelo.

Agua enriquecida: el agua a la que se ha añadido sustancia problema.

Sustancia problema: toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M4

Apéndice 2

Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius*

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también constituye un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse rellenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).

2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

Agua de dilución

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo desclorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de emplearla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo, sin destruir los tubos de las larvas.

Alimentación de las larvas

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), al ritmo de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Esta preparación puede administrarse al ritmo de unos 5 ml por recipiente al día y ha de agitarse antes de usarse. Las larvas más viejas pueden recibir más cantidad.

5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Es necesario supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.

6. Es posible añadir también algunas células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) cuando se establecen recipientes de cultivo nuevos.

Alimentación de los adultos aparecidos

7. Algunos experimentadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos aparecidos.

▼M4

Aparición de adultos

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas a los 13-15 días aproximadamente. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas.

Masas de huevos

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse cuidadosamente y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para iniciar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, 2-4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.

10. Las larvas en primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 – 3 días.

Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos de cultivo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

Preparación de las soluciones de ensayo M4 y M7

12. Elendt (1990) describió el medio M4. El M7 se prepara como el medio M4, salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en el cuadro 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio M7 que en el M4. Se está preparando una publicación sobre el medio M7 (Elendt, comunicación personal). La solución de ensayo no debe prepararse siguiendo a Elendt y Bias (1990), ya que no son adecuadas las concentraciones de $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 y K_2HPO_4 dadas para la preparación de las soluciones madre.

Preparación del medio M7

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase el cuadro 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que se dan en el cuadro 2 y se enrasa a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio M7. Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas a agua desionizada como se indica en el cuadro 3, y se añaden al medio M7 final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo (la solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas). El medio se airea y se estabiliza.

Cuadro 1

Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7

Soluciones madre (I)	Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada	Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada		Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluciones madre (I)	Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada	Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada		Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.
(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

Cuadro 2

Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Cuadro 3

Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7

Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitaminas.

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
Clorhidrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFÍA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna. Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apéndice 3

PREPARACIÓN DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL

Composición del sedimento

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

Componente	Características	% de sedimento en peso seco
Turba	Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire	4-5
Arena de cuarzo	Granulometría: > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 µm	75-76
Caolín	Contenido en caolinita ≥ 30 %	20
Carbono orgánico	Ajustado mediante adición de turba y arena	2 (± 0,5)
Carbonato de calcio	$CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro	0,05 - 0,1
Agua	Conductividad ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Preparación

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a 6,0 ± 0,5. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30-50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido en carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

Almacenamiento

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

BIBLIOGRAFÍA:

Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Apéndice 4

Características químicas aceptables del agua de dilución

Sustancia	Concentraciones
Materia en partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoníaco no ionizado	< 1 µg/l
Dureza expresada en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

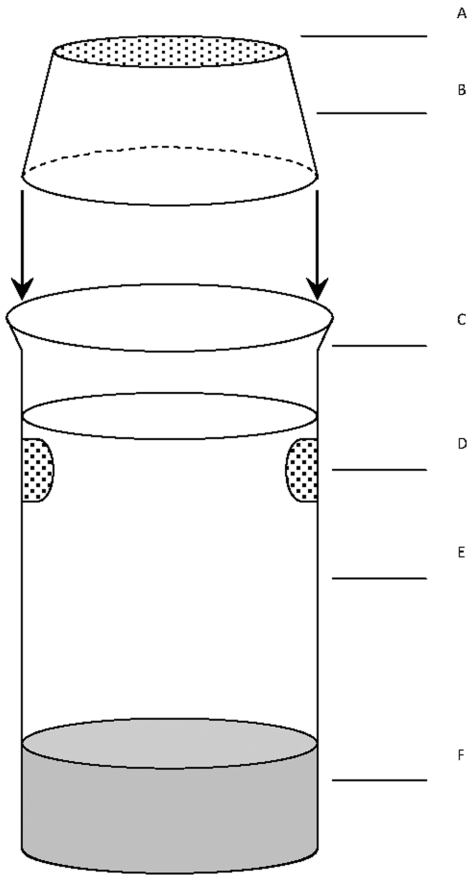
(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

▼**M4**

Apéndice 5

Orientaciones para el seguimiento de la aparición de las larvas de quironómidos

Se ponen trampas de aparición en los vasos del ensayo. Estas trampas tienen que mantenerse desde el día 20 hasta el final del ensayo. A continuación figura el esquema de un ejemplo de trampa:



A: tamiz de nailon

B: tazas de plástico invertidas

C: vaso de exposición sin pico

D: mirilla de tamiz para intercambio de agua

E: agua

F: sedimento

▼M4

C.29. BIODEGRADABILIDAD FÁCIL—CO_2 EN RECIPIENTES SELLADOS (ENSAYO DEL ESPACIO DE CABEZA)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 310 (2006). El presente método de ensayo es un método exploratorio para la evaluación de la biodegradabilidad fácil de las sustancias y aporta información similar a los seis métodos de ensayo descritos en el capítulo C.4-A a F del presente anexo. Por tanto, una sustancia que tenga resultados positivos con el presente método de ensayo puede considerarse fácilmente biodegradable y, en consecuencia, rápidamente degradable en el medio ambiente.

2. Normalmente, la primera opción para someter a ensayo las sustancias poco solubles y las que se adsorben mucho ha sido el reconocido método del dióxido de carbono (CO_2) (1), basado en el ensayo original de Sturm (2) para evaluar la biodegradabilidad de las sustancias orgánicas, mediante la medición del dióxido de carbono producido por la acción microbiana. También se ha elegido para sustancias solubles (pero no volátiles), ya que el desprendimiento de dióxido de carbono es ampliamente considerado como la única prueba inequívoca de actividad microbiana. La eliminación del carbono orgánico disuelto puede verse afectada por procesos fisicoquímicos, como la adsorción, la volatilización, la precipitación o la hidrólisis, así como por la actividad microbiana, y son muchas las reacciones no biológicas que consumen oxígeno, mientras que es raro que se produzca CO_2 a partir de sustancias orgánicas de forma abiótica. En el ensayo de Sturm, tanto original como modificado (1) (2), el CO_2 pasa de la fase líquida a los recipientes absorbentes por arrastre (es decir, burbujeando aire tratado a través del medio líquido para eliminar el CO_2), mientras que en la versión de Larson (3) (4) el CO_2 se transfiere desde el recipiente de reacción a los absorbentes pasando aire exento de CO_2 a través del espacio de cabeza y, de forma adicional, sacudiendo continuamente el recipiente de ensayo. El recipiente de reacción se sacude solo en la modificación de Larson; la agitación se especifica solo para sustancias insolubles en la norma ISO 9439 (5) y en la versión original de EE. UU. (6), y en estas dos normas se especifica el arrastre en lugar de la sustitución del espacio de cabeza. En otro método oficial de la EPA norteamericana (7), basado en el método de Gledhill (8), el recipiente de reacción sacudido está cerrado a la atmósfera y el CO_2 producido se recoge en una trampa alcalina interna directamente desde la fase gaseosa, como en los frascos del respirómetro clásico de Warburg/Barcroft.

3. Sin embargo, se ha demostrado que se acumula carbono inorgánico (CI) en el medio durante la aplicación del ensayo de Sturm normal y modificado a una serie de sustancias (9). Durante la degradación de 20 mg C/l de anilina se encontró una concentración de CI de hasta 8 mg/l. Así pues, la recogida de CO_2 en las trampas alcalinas no refleja fielmente la cantidad de CO_2 producida por los microorganismos en fases intermedias de la degradación. Como resultado, la especificación de que > 60 % de la producción maxima teórica de CO_2 (CO_2T) debe recogerse dentro de un período de observación de 10 días (los 10 días inmediatamente siguientes a la consecución del 10 % de la biodegradación) para que una sustancia problema se clasifique como fácilmente biodegradable, no se cumplirá en el caso de ciertas sustancias que sí se clasificarían en esa categoría si se utilizara el método de la eliminación del carbono orgánico disuelto (COD).

4. Cuando el porcentaje de degradación es menor que el valor previsto, es posible que se acumule CI en la solución de ensayo. En tales casos, la degradabilidad puede evaluarse con los otros ensayos de biodegrabilidad fácil.

▼M4

5. Otros inconvenientes de la metodología de Sturm (que es engorrosa, exige mucho tiempo, se presta más al error experimental y no es aplicable a las sustancias volátiles) ya antes habían incitado a buscar una técnica de recipiente cerrado, distinta de la Geldhill, en lugar del burbujeo de gas (10) (11). Boatman *et al* (12) revisaron los métodos anteriores y adoptaron un sistema de espacio de cabeza cerrado en el que se desprendía el CO_2 a ese espacio al final de la incubación, al acidificar el medio. El CO_2 se midió analizando el carbono inorgánico mediante cromatografía de gases (GC) en muestras tomadas de forma automática en el espacio de cabeza, pero sin tener en cuenta el carbono inorgánico disuelto (CID) en la fase líquida. Además, los recipientes empleados eran muy pequeños (20 ml), con tan solo 10 ml de medio, lo que provocaba problemas, por ejemplo cuando se añadían las cantidades necesariamente muy pequeñas de sustancias problema insolubles, o en el medio inoculado podía no haber microorganismos competentes (o no haberlos en número suficiente) para degradar las sustancias problema.

6. Estas dificultades se han vencido mediante los estudios independientes de Struijs y Stoltenkamp (13) y de Birch y Fletcher (14), el último de los cuales se inspiró en su experiencia con los aparatos utilizados en el ensayo de degradación anaeróbica (15). En el primer método (13) se mide el CO_2 en el espacio de cabeza tras acidificación y equilibrado, mientras que en el segundo (14) el CID se mide tanto en la fase gaseosa como en la líquida, sin tratamiento; más del 90 % del CI formado se encontraba en la fase líquida. Ambos métodos aventajan al ensayo de Sturm en el sentido de que su sistema de ensayo es más compacto y manejable, es posible utilizarlos con sustancias químicas y evitan la posibilidad de retrasos en la medición del CO_2 producido.

7. Los dos enfoques se combinaron en la norma ISO sobre el CO_2 en el espacio de cabeza (16), que se sometió a un estudio interlaboratorios (17), y es esta norma la que forma la base del presente método de ensayo. De forma similar, los dos enfoques se han utilizado en el método de la EPA de EE. UU. (18). Se han recomendado dos métodos de medición del CO_2, a saber, el CO_2 en el espacio de cabeza previa acidificación (13) y el CI en la fase líquida tras la adición de un exceso de álcali. Este último método fue introducido por Peterson durante el ensayo interlaboratorios CONCAWE (19) de este método de espacio de cabeza modificado para medir la biodegradabilidad intrínseca. Los cambios efectuados en la revisión de 1992 (20) de los métodos del capítulo C.4 del presente anexo para estudiar la biodegradabilidad fácil se han incorporado al presente método de ensayo, de forma que, por lo demás, las condiciones (medio, duración, etc.) son las mismas que en el ensayo revisado de Sturm (20). Birch y Fletcher (14) han señalado que con este ensayo de espacio de cabeza se obtenían resultados muy similares a los obtenidos con las mismas sustancias en el ensayo interlaboratorios de la OCDE (21) de los métodos de ensayo revisados.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. La sustancia problema, normalmente a la concentración de 20 mg C/l, como única fuente presente de carbono y de energía, se incuba en un medio amortiguador de sales minerales que se ha inoculado con una población mixta de microorganismos. El ensayo se lleva a cabo en frascos cerrados con un espacio de cabeza lleno de aire, que aporta una reserva de oxígeno para la biodegradación aerobia. El desprendimiento de CO_2 derivado de la degradación aerobia final de la sustancia problema se determina midiendo el CI producido en los frascos de ensayo en exceso respecto al producido en los recipientes en blanco que contienen solamente medio inoculado. El grado de biodegradación se expresa en porcentaje de la producción máxima teórica de CI (CITe), sobre la base de la cantidad de sustancia problema (en carbono orgánico) añadida inicialmente.

9. También puede medirse la eliminación del COD y/o el grado de biodegradación primaria de la sustancia problema (20).

▼M4

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

10. Es preciso conocer el contenido de carbono orgánico (% p/p) de la sustancia problema, bien por su estructura química o bien por medición, de forma que sea posible calcular el porcentaje de degradación. En el caso de las sustancias problema volátiles, es útil disponer de la constante de la ley de Henry, medida o calculada, para determinar una relación adecuada entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido. También es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos a la hora de seleccionar una concentración de ensayo adecuada y para interpretar los resultados que indiquen escasa biodegradabilidad: se recomienda incluir un control de la inhibición salvo que se sepa que la sustancia problema no es inhibidora de la actividad microbiana (véase el punto 24).

APLICABILIDAD DEL MÉTODO

11. El ensayo es aplicable a las sustancias problema hidrosolubles e insolubles, aunque debe velarse por conseguir una buena dispersión de la sustancia problema. Utilizando la relación recomendada entre volumen del espacio de cabeza y volumen del líquido de 1:2, las sustancias volátiles con una constante de la ley de Henry de hasta 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ pueden someterse a ensayo, ya que la proporción de la sustancia problema en el espacio de cabeza no superará el valor del 1 % (13). Puede utilizarse un volumen menor del espacio de cabeza cuando se estudien sustancias que sean más volátiles pero cuya biodisponibilidad pueda ser limitante, en particular si son poco solubles en agua. Sin embargo, los usuarios deben velar por que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido y la concentración de la sustancia problema sean tales que se disponga de suficiente oxígeno para que pueda darse una biodegradación aerobia completa (es decir, evitar el uso de una concentración elevada de sustrato y un pequeño volumen del espacio de cabeza). Pueden encontrarse orientaciones sobre esta cuestión en las referencias 13 y 23.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

12. Para comprobar el procedimiento del ensayo, debe someterse al mismo, en paralelo, una sustancia de referencia de biodegradabilidad conocida. A estos efectos, pueden utilizarse anilina, benzoato de sodio o etilenglicol para el ensayo de sustancias problema hidrosolubles, y 1-octanol para el de sustancias problema poco solubles (13). La biodegradación de estas sustancias debe llegar a > 60 % del CITe en el plazo de 14 días.

REPRODUCIBILIDAD

13. En el ensayo interlaboratorios del método (17), se obtuvieron los siguientes resultados aplicando las condiciones recomendadas, incluida la concentración de 20 mg C de sustancia problema por litro.

Sustancia problema	Porcentaje medio de biodegradación (28 d)	Coeficiente de variación (%)	Número de laboratorios
Anilina	90	16	17
1-Octanol	85	12	14

La variabilidad dentro del ensayo (reproducibilidad), utilizando anilina, era baja, con coeficientes de variabilidad no superiores al 5 % en casi todas las tandas de ensayos. En los dos casos en que la reproducibilidad era peor, la mayor variabilidad se debía probablemente a la alta producción de CI en las pruebas en blanco. La reproducibilidad era peor con el 1-octanol, pero aún así era menor del 10 % en el 79 % de las tandas de ensayos. Esta mayor variabilidad dentro del ensayo puede haberse debido a errores en la dosificación, ya que es necesario inyectar pequeños volúmenes (de 3 a 4 µl) de 1-octanol en frascos de ensayo sellados. Se encuentran mayores coeficientes de variación cuando se emplean concentraciones menores de sustancia problema, especialmente concentraciones inferiores a 10 mg C/l. Esto puede superarse parcialmente reduciendo la concentración de carbono inorgánico total (CIT) en el inóculo.

▼M4

14. En un ensayo interlaboratorios de la UE (24) de cinco agentes tensioactivos a la concentración de 10 mg de C/l se obtuvieron los siguientes resultados:

Sustancia problema	Porcentaje medio de biodegradación (28 d)	Coeficiente de variación (%)	Número de laboratorios
Tetrapropileno-benceno-sulfonato	17	45	10
Di-iso-octilsulfo-succinato (aniónico)	72	22	9
Cloruro de hexadecil-trimetilamonio (*) (catiónico)	75	13	10
Iso-nonilfenol -(etoxilato)$_9$ (no iónico)	41	32	10
Coco-amida-propil dimetilhidroxi sulfobetaína (anfótera)	60	23	11

(*) Se añade SiO_2 para neutralizar la toxicidad.

Los resultados indican que, en general, la variabilidad era mayor con los agentes tensioactivos menos degradados. La variabilidad dentro del ensayo era inferior al 15 % en más del 90 % de los casos, y los valores máximos llegaban al 30-40 %.

NOTA: La mayoría de los agentes tensioactivos no son especies moleculares únicas sino mezclas de isómeros, homólogos, etc., que se degradan tras períodos de latencia característicos diferentes y con tasas cinéticas diferentes, lo que se plasma en curvas atenuadas, "borrosas", de forma que el valor de corte del 60 % puede no ser alcanzado dentro del período de observación de 10 días, incluso aunque cada especie molecular individual superara ese valor en el plazo de 10 días si se ensayara sola. Esto puede observarse también con otras mezclas complejas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

15. Equipo normal de laboratorio, además de lo siguiente:

a) Frascos de suero de vidrio, cerrados con tapones de caucho butílico y cápsulas de aluminio. El tamaño recomendado es de "125 ml", con un volumentotal de unos 160 ml (en este caso, es necesario saber que el volumen de cada frasco es de 160 ± 1 ml). Puede emplearse un tamaño menor de recipiente cuando los resultados cumplen las condiciones descritas en los puntos 66 y 67.

b) Analizador de carbono u otro instrumento (por ejemplo, cromatógrafo de gases) para medir el carbono inorgánico.

▼M4

c) Jeringas de alta precisión para tomar muestras gaseosas y líquidas.

d) Agitador orbital en un ambiente de temperatura controlada.

e) Aporte de aire exento de CO_2; puede prepararse haciendo pasar aire a través de gránulos de cal sodada o utilizando una mezcla gaseosa con 80 % N_2/20 % O_2 (opcional) (véase el punto 28).

f) Dispositivo de filtración por membrana de 0,20-0,45 μm de porosidad (opcional).

g) Analizador de carbono orgánico (opcional).

Reactivos

16. Deben utilizarse siempre reactivos de pureza analítica.

Agua

17. Debe utilizarse agua destilada o desionizada, con ≤ 1 mg/l de carbono orgánico total. Esto corresponde a ≤ 5 % del contenido de carbono orgánico inicial introducido por la dosis recomendada de la sustancia problema.

Soluciones madre para el medio de sales minerales

18. Las soluciones madre y el medio de sales minerales son similares a los de los ensayos de la norma ISO 14593 (16) y del capítulo C.4 "biodegradabilidad fácil" (20). El uso de una concentración superior de cloruro de amonio (2,0 g/l en lugar de 0,5 g/l) debe ser necesario solo en casos muy excepcionales como, por ejemplo, cuando la concentración de la sustancia problema es > 40 mg C/l. Las soluciones madre deben conservarse refrigeradas y se eliminarán al cabo de seis meses, o antes si aparecen signos de precipitación o de crecimiento microbiano. Deben prepararse los seis frascos siguientes:

a) Fosfato de dihidrógeno y potasio (KH_2PO_4) 8,50 g

Fosfato de hidrógeno y dipotasio (K_2HPO_4) 21,75 g

Fosfato de hidrógeno y disodio dihidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Cloruro de amonio (NH_4Cl) 0,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro. El pH de esta solución debe ser 7,4 (± 0,2). Si no es así, debe prepararse una solución nueva.

b) Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

c) Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

d) Cloruro de hierro (III) hexahidratado ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro; añadir una gota de HCl concentrado.

Preparación del medio mineral

19. Se mezclan 10 ml de la solución a) con unos 800 ml de agua (véase el punto 17), se añade a continuación 1 ml de las soluciones b), c) y d) y se enrasa a 1 litro con agua (punto 17).

Otros reactivos

20. Ácido ortofosfórico concentrado (H_3PO_4) (> 85 %, peso en volumen).

▼M4

Solución de hidróxido de sodio 7M

21. Se disuelven 280 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 1 litro de agua (punto 17). Se determina la concentración de CID de esta solución y se tiene en cuenta este valor cuando se calcule el resultado del ensayo (véanse los puntos 55 y 61), especialmente en función del criterio de validez del punto 66 b). Si la concentración de CID es demasiado elevada, debe prepararse una solución nueva.

Sustancia problema

22. Preparar una solución madre de una sustancia problema suficientemente hidrosoluble, en agua (punto 17) o en el medio de ensayo (punto 19), a una concentración preferiblemente 100 veces mayor que la concentración final que se vaya a emplear en el ensayo; puede ser necesario ajustar el pH de la solución madre. La solución madre debe añadirse al medio mineral para conseguir una concentración final de carbono orgánico entre 2 y 40 mg C/l, preferiblemente 20 mg C/l. Si se utilizan concentraciones menores que estas, la precisión obtenida puede verse afectada. Las sustancias líquidas solubles e insolubles pueden añadirse a los recipientes directamente mediante jeringas de precisión. Puede ser necesario aplicar un tratamiento especial a las sustancias problema poco solubles o insolubles (25). Las opciones son las siguientes:

a) adición directa de cantidades pesadas conocidas;

b) dispersión con ultrasonidos antes de la adición;

c) dispersión con ayuda de agentes emulgentes, de los que se determinará si tienen algún efecto inhibidor o estimulante de la actividad microbiana antes de añadir la sustancia problema;

d) adsorción de sustancias problema líquidas, o de una solución en un disolvente volátil adecuado, a un medio o soporte inerte (por ejemplo, filtro de fibras de vidrio), seguida de evaporación del disolvente eventualmente empleado, y adición directa de cantidades conocidas;

e) adición de un volumen conocido de una solución de la sustancia problema en un disolvente muy volátil a un recipiente de ensayo vacío, seguido de evaporación del disolvente.

Hay que someter a ensayo los agentes o disolventes utilizados en las letras c), d) y e) para comprobar si tienen efecto estimulante o inhibidor sobre la actividad microbiana [véase el punto 42 b)].

Sustancia de referencia

23. Preparar una solución madre de la sustancia de referencia (soluble) en agua (punto 17), a una concentración de preferencia 100 veces mayor que la concentración final que se vaya a emplear en el ensayo (20 mg C/l).

Comprobación de la inhibición

24. Es frecuente que las sustancias problema no muestren degradación significativa en las condiciones aplicadas en las evaluaciones de la biodegradación fácil. Una de las posibles causas es que la sustancia problema sea inhibidora para el inóculo a la concentración a la que se aplica en el ensayo. Puede incluirse en el diseño del ensayo una comprobación de la inhibición para facilitar la identificación (*a posteriori*) de la inhibición como posible causa o factor contribuyente. Por el contrario, la comprobación de la inhibición puede excluir tales interferencias y mostrar que la degradación nula o escasa debe atribuirse solo a que los microorganismos no son capaces de atacar la sustancia en la condiciones del ensayo. A fin de obtener información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos (aerobios), preparar una solución del medio de ensayo con la sustancia problema y la sustancia de referencia (punto 19), cada una a las mismas concentraciones que se añaden en el ensayo en sí (véanse los puntos 22 y 23).

▼M4

Inóculo

25. El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, efluente de aguas residuales (no cloradas), aguas superficiales y suelos, o de una mezcla de estas (20). La actividad biodegradante de la fuente debe comprobarse utilizando una sustancia de referencia. Independientemente de la fuente, no deben utilizarse microorganismos que se hayan expuesto anteriormente a la sustancia problema, si se quiere emplear el procedimiento como ensayo de la biodegradabilidad fácil.

Advertencia: Hay que manejar con cuidado el lodo activado, las aguas residuales y los efluentes de aguas residuales, debido a su contenido en organismos patógenos.

26. Según la experiencia, el volumen óptimo del inóculo es aquel que:

— resulta suficiente para dar una actividad de biodegradación adecuada,

— degrada la sustancia de referencia en el porcentaje estipulado (véase el punto 66),

— da entre 10^2 y 10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro en la mezcla final,

— da normalmente una concentración de 4 mg/l de sólidos en suspensión en la mezcla final cuando se utiliza lodo activado; es posible emplear concentraciones de hasta 30 mg/l, pero pueden aumentar significativamente la producción de CO_2 de los blancos (26),

— contribuye con menos del 10 % de la concentración inicial de carbono orgánico introducido por la sustancia problema,

— se encuentra generalmente en la banda de 1 a 10 ml de inóculo por litro de solución de ensayo.

Lodo activado

27. Se recoge, justo antes del proceso, lodo activado del depósito de aireación de una depuradora de aguas residuales o de una instalación de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas. En caso necesario, deben retirarse las partículas gruesas por tamizado (por ejemplo, con un tamiz de 1 mm^2 de malla) y el lodo ha de mantenerse en condiciones aerobias hasta el momento de su utilización.

28. También, después de eliminar las eventuales partículas gruesas, puede dejarse sedimentar o centrifugarse (por ejemplo, 1 100 × g durante 10 min). Se desecha el sobrenadante. El lodo puede lavarse en la solución de minerales. Se suspende el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 g de sólidos en suspensión/1 y después se somete a aireación hasta que se utilice.

29. El lodo debería obtenerse de una depuradora convencional que trabaje adecuadamente. Si el lodo tiene que obtenerse de una depuradora de elevado rendimiento o se piensa que contiene inhibidores, debería lavarse. El lodo resuspendido se mezcla bien y a continuación se deja sedimentar o se centrifuga, se desecha el sobrenadante y se vuelve a suspender el lodo lavado en otro volumen de medio mineral. Este procedimiento se repite hasta que se considere que el lodo queda exento de un exceso de sustrato o de inhibidor.

30. Después de conseguir la resuspensión completa, o con el lodo sin tratar, se toma una muestra justo antes de su utilización para determinar el peso seco de los sólidos en suspensión.

31. Otra posibilidad diferente es homogeneizar lodo activado (de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/1). Se trata el lodo en un mezclador Waring durante 2 minutos a velocidad media. El lodo mezclado se deja sedimentar durante 30 minutos, o más en caso necesario, y se decanta el líquido para utilizarlo como inóculo en la proporción de unos 10 mg/l de medio mineral.

▼M4

32. Puede conseguirse una reducción aún mayor del desprendimiento de CO_2 en el blanco aireando el lodo hasta el día siguiente con aire exento de CO_2. Utilizar como concentración del inóculo en este ensayo 4 mg/l de sólidos del lodo activado (13).

Efluente secundario de aguas residuales

33. El inóculo puede obtenerse también a partir del efluente secundario de una depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Mantener la muestra en condiciones aerobias y utilizarla el día de la toma, o acondicionarla previamente en caso necesario. El efluente debe filtrarse por un filtro grueso para eliminar las partículas gruesas y se mide el valor del pH.

34. Para reducir su contenido de CI, se hace pasar por el filtrado aire exento de CO_2 (punto 15, letra e) durante 1 h, manteniendo el pH a 6,5 mediante el uso de ácido ortofosfórico (punto 20). El valor del pH se restaura a su valor original con hidróxio de sodio (punto 21) y, después de dejar sedimentar durante 1 h aproximadamente, se toma un volumen adecuado del sobrenadante para la inoculación. Este procedimiento de arrastre reduce el contenido de CI del inóculo. Por ejemplo, cuando se utilizaba como inóculo el volumen recomendado máximo de efluente sometido al arrastre y filtrado (100 ml) por litro, la cantidad de CI presente en los recipientes de control en blanco estaba en la banda de 0,4-1,3 mg/l (14), lo que correspondía a entre el 2 y el 6,5 % del C de la sustancia problema a 20 mg C/l y entre el 4 y el 13 % a 10 mg C/l.

Aguas superficiales

35. Se toma una muestra de un agua superficial adecuada. Debe mantenerse en condiciones aerobias y utilizarse el mismo día de la toma. En caso necesario, la muestra debe concentrarse por filtración o centrifugación. El volumen de inóculo que se vaya a utilizar en cada recipiente de ensayo debe cumplir los criterios del punto 26.

Suelos

36. Se toma una muestra de un suelo adecuado, recogida a una profundidad de hasta 20 cm por debajo de la superficie del suelo. Hay que retirar las piedras, restos vegetales e invertebrados de la muestra de suelo antes de pasarla por un tamiz de 2 mm de malla (si la muestra está demasiado húmeda para tamizarla inmediatamente, se deja secar parcialmente al aire para facilitar el tamizado). Debe mantenerse en condiciones aerobias y utilizarse el mismo día de la toma; si la muestra se transporta en una bolsa de polietileno negra sin cerrar completamente, puede conservarse en la bolsa hasta un mes a una temperatura de entre 2 y 4 °C.

Preacondicionamiento del inóculo

37. Los inóculos pueden estar preacondicionados a las condiciones experimentales, pero no preadaptados a la sustancia problema. El preacondicionamiento puede reducir el desprendimiento de CO_2 del blanco. El preacondicionamiento consiste en airear el lodo activado, tras diluirlo en el medio de ensayo hasta una concentración de 30 mg/l, con aire húmedo exento de CO_2 durante un máximo de 5 o 7 días a la temperatura del ensayo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de frascos

38. El número de frascos [punto 15, letra a)] necesarios para un ensayo dependerá de la frecuencia de los análisis y de la duración del ensayo.

39. Se recomienda analizar frascos por triplicado tras un número suficiente de intervalos de tiempo, de forma que pueda señalarse el período de observación de 10 días. También se analizan al final del ensayo al menos cinco frascos de ensayo [punto 15, letra a)] de los conjuntos a), b) y c) (véase el punto 42), para permitir el cálculo de los intervalos de confianza del 95 % del valor medio del porcentaje de biodegradación.

▼M4

Medio inoculado

40. El inóculo se emplea a la concentración de 4 mg/l de sólidos secos del lodo activado. Preparar inmediatamente antes del uso una cantidad suficiente de medio inoculado añadiendo, por ejemplo, 2 ml de lodo activado tratado de forma adecuada (puntos 27 a 32) a la concentración de 2 000 mg/l a 1 litro de medio de sales minerales (punto 19). Cuando deba utilizarse efluente secundario de aguas residuales, añadir hasta 100 ml de efluente (punto 33) a 900 ml de medio de sales minerales (punto 19) y enrasar a 1 litro con medio.

Preparación de los frascos

41. Se ponen en frascos replicados alícuotas de medio inoculado para obtener una relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido de 1:2 (por ejemplo, añadir 107 ml a frascos de 160 ml de capacidad). Es posible utilizar otras proporciones, pero téngase en cuenta la advertencia del punto 11. Independientemente del tipo de inóculo utilizado, ha de ponerse atención para que el medio inoculado se mezcle adecuadamente a fin de garantizar que se distribuye de manera uniforme en los frascos de ensayo.

42. Se preparan conjuntos de frascos [punto 15, letra a)] que contengan lo siguiente:

a) recipientes de ensayo (denominados F_T) que contengan la sustancia problema;

b) controles en blanco (denominados F_B) que contengan el medio de ensayo más el inóculo; deben añadirse también las eventuales sustancias, disolventes, agentes o filtros de fibra de vidrio que se utilicen para introducir la sustancia problema en los recipientes de ensayo;

c) recipientes (denominados F_C) para comprobar el procedimiento que contengan la sustancia de referencia;

d) en caso necesario, recipientes (denominados F_I) para comprobar un posible efecto inhibidor de la sustancia problema que contengan tanto la sustancia problema como la sustancia de referencia a las mismas concentraciones (punto 24) que se encuentran en los frascos F_T y F_C, respectivamente;

e) recipientes (denominados F_S) para comprobar una possible degradación abiótica como en la letra a) más 50 mg/l $HgCl_2$ o esterilizados de alguna otra manera (por ejemplo, mediante autoclavado).

43. Las sustancias problema y sustancias de referencia hidrosolubles se añaden como soluciones madre acuosas (puntos 22, 23 y 24) para dar una concentración de entre 10 y 20 mg C/l.

44. Las sustancias problema y sustancias de referencia insolubles se añaden a los frascos de diversas formas [véase el punto 22, letras a) a e)] según la naturaleza de la sustancia problema, bien antes o bien después de la adición del medio inoculado, en función del método de tratamiento de la sustancia problema. Si se aplica uno de los procedimientos indicados en el punto 22, letras a) a e), los frascos en blanco F_B [punto 42, letra b)] deben tratarse de forma similar, pero excluyendo la sustancia problema o la sustancia de referencia.

45. Las sustancias problema volátiles deben inyectarse en frascos sellados (punto 47) mediante una microjeringa. La dosis se calcula a partir del volumen inyectado y de la densidad de la sustancia problema.

46. En caso necesario, se añade agua a los recipientes para obtener el mismo volumen de líquido en cada uno de ellos. Ha de velarse por que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido (normalmente, 1:2) y la concentración de la sustancia problema sean tales que se disponga de suficiente oxígeno en el espacio de cabeza para permitir una biodegradación completa.

▼M4

47. A continuación se sellan todos los frascos, por ejemplo con diafragmas de caucho butílico y cápsulas de aluminio. Las sustancias problema volátiles deben añadirse en esta fase (punto 45). Si ha de seguirse el descenso de la concentración de COD de la solución de ensayo y han de realizarse análisis a tiempo cero para determinar la concentración de CI inicial [controles estériles, punto 42, letra e)] u otros parámetros, tomar una muestra apropiada del recipiente de ensayo. Este recipiente y su contenido se desechan a continuación.

48. Los frascos sellados se colocan en un agitador rotatorio [punto 15, letra d)], con una velocidad de agitación suficiente para mantener el contenido de los frascos bien mezclado y en suspensión (por ejemplo, de 150 a 200 rpm), y se incuban a oscuras y a 20 °C, con una precisión de ± 1 °C.

Muestreo

49. El patrón de muestreo dependerá del período de latencia y de la tasa cinética de biodegradación de la sustancia problema. Se toman frascos para analizarlos el mismo día del muestreo, que debe hacerse al menos una vez por semana o con más frecuencia (por ejemplo, dos veces por semana) si hace falta obtener la curva de degradación completa. Se toma del agitador el número necesario de frascos replicados, que correspondan a F_T, F_B y F_C y, cuando se utilicen, F_I y F_S (véase el punto 42). El ensayo dura normalmente 28 días. Si la curva de biodegradación indica que se alcanza una meseta antes del día 28, el ensayo puede darse por concluido sin llegar al día 28. Tomar muestras de los cinco frascos reservados para el día 28 del ensayo a fin de analizarlas y utilizar los resultados para calcular los límites de confianza o el coeficiente de variación del porcentaje de degradación. No es necesario tomar con tanta frecuencia como de los demás frascos muestras de los que correspondan a las comprobaciones de la inhibición y de la degradación abiótica; es suficiente con los días 1 y 28.

Análisis de carbono inorgánico (CI)

50. La producción de CO_2 en los frascos se determina midiendo el aumento de la concentración de carbono inorgánico (CI) durante la incubación. Se dispone de dos métodos recomendados para medir la cantidad de CI producida en el ensayo, y se describen inmediatamente a continuación. Dado que los métodos pueden dar resultados ligeramente diferentes, en cada tanda de ensayos hay que utilizar uno solo.

51. Se recomienda el método a) si resulta probable que el medio contenga restos de, por ejemplo, un papel de filtro de vidrio o sustancia problema insoluble. Este análisis puede realizarse utilizando un cromatógrafo de gases si no se dispone de analizador de carbono. Es importante que los frascos estén a la temperatura del ensayo (o cerca de esta) cuando se analice el gas del espacio de cabeza. El método b) puede ser más fácil para los laboratorios que utilicen analizadores de carbono para medir el CI. Es importante que la solución de hidróxido de sodio (punto 21) utilizada para convertir el CO_2 en carbonato sea recién preparada o bien que se conozca su contenido en CI, de forma que este pueda tenerse en cuenta a la hora de calcular los resultados del ensayo [véase el punto 66, letra b)].

Método a): acidificación a pH < 3

52. Antes de cada lote de análisis, se calibra el analizador de CI utilizando un patrón adecuado de CI (por ejemplo, CO_2 al 1 % p/p en N_2). Se inyecta ácido ortofosfórico concentrado (punto 20) a través del diafragma de cada frasco de la muestra para reducir el pH del medio a<3 (por ejemplo, añadir 1 ml a 107 ml de medio de ensayo). Los frascos se vuelven a colocar en el agitador. Tras agitar durante una hora a la temperatura de ensayo, se sacan los frascos del agitador, se retiran alícuotas (por ejemplo, de 1 ml) de gas del espacio de cabeza de cada frasco y se inyectan en el analizador de CI. Las concentraciones medidas de CI se registran en mg C/l.

▼M4

53. El principio del presente método consiste en que, tras la acidificación hasta un pH<3 y la estabilización a 20 °C, la constante de equilibrio para la distribución del CO_2 entre las fases líquida y gaseosa de los frascos de ensayo es de 1,0 cuando se mide en concentraciones (13). Es necesario demostrar al menos una vez que esto es así con el sistema de ensayo, de la manera siguiente:

Preparar frascos con 5 y 10 mg/l de CI utilizando una solución de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) en agua exenta de CO_2, obtenida acidificando agua hasta llegar a un pH de 6,5 con ácido ortofosfórico concentrado (punto 20), burbujeando hasta el día siguiente aire exento de CO_2 y elevando el pH con álcali hasta llegar a la neutralidad. Asegurarse de que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido es la misma que en los ensayos (por ejemplo, de 1:2). Acidificar y equilibrar como se describe en el punto 52, y medir las concentraciones de CI tanto en la fase del espacio de cabeza como en la del líquido. Comprobar que las dos concentraciones son la misma, teniendo en cuenta el error experimental. En caso contrario, el operario debe revisar los procedimientos. No es necesario efectuar esta verificación de la distribución del CI entre las fases líquida y gaseosa cada vez que se realiza el ensayo; en principio puede hacerse durante la calibración.

54. Si se quiere medir la eliminación del COD (solo con sustancias problema hidrosolubles), hay que tomar muestras de la fase líquida de distintos frascos (no acidificados), filtrarlas por membrana e inyectarlas en el analizador de COD. Estos frascos pueden utilizarse en otros análisis en caso necesario, para medir la biodegradación primaria.

Método b): conversión del CO_2 en carbonato

55. Antes de cada lote de análisis, calibrar el analizador de CI utilizando un patrón adecuado como, por ejemplo, una solución de bicarbonato sódico ($NaHCO_3$) en agua exenta de CO_2 (véase el punto 53) en la banda de 0 a 20 mg/l de CI. Inyectar solución de hidróxido de sodio (7 M, punto 21) (por ejemplo, 1 ml en 107 ml de medio) a través del diafragma de cada frasco muestreado; agitar los frascos durante 1 h a la temperatura de ensayo. Usar la misma solución de NaOH en todos los frascos apartados un día determinado, pero no necesariamente en todos los muestreos efectuados a lo largo de un ensayo. Si se necesita conocer los valores absolutos de CI de los blancos en todos los muestreos, será necesario determinar el CI de la solución de NaOH cada vez que se utilice. Sacar los frascos del agitador y dejar reposar. Se retiran con jeringa volúmenes adecuados (por ejemplo, de 50 a 1 000 µl) de la fase líquida de cada recipiente. Las muestras se inyectan en el analizador de CI y se registran las concentraciones de CI. Hay que velar por que el analizador empleado esté equipado de forma adecuada para tratar las muestras alcalinas preparadas según este método.

56. El principio del presente método consiste en que, tras la adición de álcali y la agitación, se hace despreciable la concentración de CI en el espacio de cabeza. Es necesario demostrar al menos una vez que esto es así con el sistema de ensayo, utilizando patrones de CI, añadiendo álcali y dejando equilibrar, para medir a continuación la concentración de CI tanto en la fase del espacio de cabeza como en la líquida (véase el punto 53). La concentración en el espacio de cabeza debe aproximarse a cero. Esta comprobación de que la absorción de CO_2 es prácticamente total no resulta necesario hacerla cada vez que se realiza el ensayo.

57. Si se quiere medir la eliminación del COD (solo con sustancias problema hidrosolubles), hay que tomar muestras de la fase líquida de distintos frascos (a los que no se ha añadido álcali), filtrarlas por membrana e inyectarlas en el analizador de COD. Estos frascos pueden utilizarse en otros análisis en caso necesario, para medir la biodegradabilidad primaria.

▼M4

DATOS E INFORME

Cálculo de los resultados

58. Suponiendo una mineralización del 100 % de la sustancia problema en CO_2, el CITe que supere el producido en los controles en blanco equivale al COT añadido a cada frasco de ensayo al inicio del ensayo; es decir:

$$CITe = COT$$

La masa total (mg) del carbono inorgánico (CIT) de cada frasco es:

$$CIT = (\text{mg C en el líquido} + \text{mg C en el espacio de cabeza}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Ecuación [1]}$$

donde:

V_L = volumen de líquido en el frasco (litros);

C_L = concentración de CI en el líquido (mg/l en carbono);

V_H = volumen del espacio de cabeza (litros);

C_H = concentración de CI en el espacio de cabeza (mg/l en carbono).

Los cálculos del CIT de los dos métodos analíticos utilizados para medir el CI en este ensayo se describen más adelante, en los puntos 60 y 61. El porcentaje de biodegradación (% D) en cada caso viene dado por la fórmula siguiente:

$$\%D = \frac{(CIT_t - CIT_b)}{COT} \times 100 \quad \text{Ecuación [2]}$$

donde:

CIT_t = mg CIT en el frasco de ensayo en el tiempo t;

CIT_b = mg CIT medio en los frascos en blanco en el tiempo t;

COT = mg COT añadidos inicialmente al recipiente de ensayo.

El porcentaje de biodegradación (% D) se calcula para los frascos de ensayo (F_T), de referencia (F_C) y, cuando se incluyan, de control del seguimiento de la inhibición (F_I) a partir de las respectivas cantidades de CIT producidas hasta cada tiempo de muestreo.

59. Si se observa un aumento significativo del contenido de CIT de los controles estériles (F_S) a lo largo del período de ensayo, puede concluirse que ha habido degradación abiótica de la sustancia problema, y hay que tener esto en cuenta al calcular el valor de D en la ecuación [2].

Acidificación a pH < 3

60. Dado que la acidificación a pH < 3 y el equilibrado resulta en la igualación de la concentración de CIT en las fases líquida y gaseosa, solo debe medirse la concentración de CI en la fase gaseosa. Así pues, de la ecuación [1] se desprende que $CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, donde V_B = volumen del frasco de suero.

Conversión del CO_2 en carbonato

61. En este método se realizan los cálculos como en la ecuación [1], pero se ignora la cantidad despreciable de CI presente en la fase gaseosa, es decir, $V_H \times C_H = 0$, y $CIT = V_L \times C_L$.

▼M4

Expresión de los resultados

62. Se obtiene una curva de biodegradación representando el porcentaje de biodegradación, D, frente al tiempo de incubación y, si es posible, se indican las fases de latencia y de biodegradación y el período de observación de 10 días, así como la fase de meseta, es decir, la fase en que se ha alcanzado la degradación máxima y se ha aplanado la curva de biodegradación. Si se obtienen resultados comparables con los recipientes de ensayo paralelos F_T (< 20 % de diferencia), se representa una curva media (véase el apéndice 2, fig.1); en caso contrario, se representan las curvas de cada recipiente. Se determina el valor medio del porcentaje de biodegradación en la fase de meseta o se evalúa el valor máximo (por ejemplo, cuando la curva decrece en la fase de meseta), pero es importante evaluar que en este último caso el valor no es anómalo. Hay que indicar este nivel máximo de biodegradación en el informe de ensayo como "grado de biodegradación de la sustancia problema". Si el número de recipientes de ensayo es insuficiente para indicar la fase de meseta, se utilizan los valores medidos el último día del ensayo para calcular el valor medio. Este último valor, la media de cinco réplicas, sirve para indicar la precisión con que se ha determinado el porcentaje de biodegradación. Indíquese también el valor obtenido al final del período de observación de 10 días.

63. De la misma manera, se representa la curva para la sustancia de referencia, F_C, y, si están incluidos, para la comprobación de la eliminación abiótica, F_S y el control de la inhibición, F_I.

64. Se registran las cantidades de CIT presentes en los controles en blanco (F_B), así como las de los frascos F_S (comprobación abiótica), si se han incuido en el ensayo los recipientes correspondientes.

65. Calcular el valor de D correspondiente a los recipientes F_I, sobre la base del rendimiento de CI teórico previsto a partir de únicamente el componente de referencia de la mezcla. Si, al día 28, $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, puede aceptarse que la sustancia problema ha inhibido la actividad del inóculo, y esto puede explicar la obtención de bajos valores de D_{FT} en las condiciones del ensayo. En este caso, el ensayo puede repetirse utilizando una concentración de ensayo menor y, de preferencia, reduciendo el CID en el inóculo y el CIT formado en los controles en blanco, ya que, si no, la menor concentración reduciría la precisión del método. También puede utilizarse otro inóculo. Si en el frasco F_S (abiótico) se observa un aumento significativo (> 10 %) en la cantidad de CIT, es posible que se hayan dado procesos de degradación abiótica.

Validez de los resultados

66. Se considera que un ensayo es válido si:

a) el valor medio del porcentaje de degradación en los recipientes F_C que contienen la sustancia de referencia es > 60 % para el 14º día de incubación, y

b) el valor medio del CIT presente en los controles en blanco F_B al final del ensayo es > 3 mg C/l.

Si no se respetan estos límites, hay que repetir el ensayo con un inóculo procedente de otra fuente o revisar los procedimientos aplicados. Por ejemplo, si la obtención de un contenido elevado de CI en los blancos es un problema, debe seguirse el procedimiento contemplado en los puntos 27 a 32.

(1) Porcentaje de degradación en los recipientes F_C que contienen la sustancia de referencia.
(2) Porcentaje de degradación en los recipientes F_I.

▼M4

67. Si la sustancia problema no alcanza el 60 % del CITe y se ha visto que no es inhibidora (punto 65), podría repetirse el ensayo con una concentración superior del inóculo (hasta 30 mg/l de lodo activado y 100 ml de efluente/l) o inóculo de otras fuentes, sobre todo si la degradación estaba en la banda del 20 al 60 %.

Interpretación de los resultados

68. Una biodegradación > 60 % del CITe en el plazo de observación de 10 días en este ensayo demuestra que la sustancia problema es fácilmente biodegradable en condiciones aerobias.

69. Si no se alcanza el umbral del 60 % del CITe, determinar el valor de pH en los medios de los frascos que no se han acidificado ni alcalinizado; un valor inferior a 6,5 podría indicar que se ha producido nitrificación. En tal caso, repítase el ensayo con una solución amortiguadora de mayor concentración.

Informe del ensayo

70. Elaborar una tabla con los valores del % D de cada uno de los frascos de ensayo (F_T), de referencia (F_C) y, si se han incluido, de control de la inhibición (F_I) correspondientes a cada día muestreado. Si se obtienen resultados comparables con los frascos replicados, trazar la curva del valor medio del % D frente al tiempo. Registrar la cantidad de CIT en los blancos (F_B) y en los controles estériles (F_S), así como el COD y otros parámetros, y su porcentaje de eliminación.

71. Determinar el valor medio del % D en la fase de meseta, o utilizar el valor máximo si la curva de biodegradación decrece en la fase de meseta, y comunicarlo como "grado de biodegradación de la sustancia problema". Es importante asegurarse de que en este último caso el valor máximo no es anómalo.

72. El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural, y propiedades fisicoquímicas pertinentes.

— Pureza (impurezas) de la sustancia problema.

Condiciones de ensayo:

— Referencia al presente método de ensayo.

— Descripción del sistema de ensayo utilizado (por ejemplo, volumen del recipiente, relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido, método de agitación, etc.).

— Aplicación de la sustancia problema y de la sustancia de referencia al sistema de ensayo: concentración de ensayo utilizada y cantidad de carbono añadida a cada frasco de ensayo, eventual uso de disolventes.

— Datos del inóculo empleado, eventual tratamiento y acondicionamiento previos.

— Temperatura de incubación.

— Validación del principio del análisis del CI.

— Características principales del analizador de IC empleado (y de otros eventuales métodos analíticos aplicados).

— Número de réplicas.

Resultados:

— Datos en bruto y valores calculados de biodegradabilidad en forma tabular.

▼M4

— Gráficas del porcentaje de degradación frente al tiempo correspondientes a la sustancia problema y a la sustancia de referencia, fase de latencia, fase de degradación, período de observación de 10 días y pendiente.

— Porcentaje de eliminación en la meseta, al final del ensayo y tras el período de observación de 10 días.

— Motivos del eventual rechazo de los resultados del ensayo.

— Cualquier otro dato que pueda ser pertinente sobre el procedimiento seguido.

— Discusión de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil". Ensayo de desprendimiento de CO_2 (método C.4-C)

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revisada en 1999). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método por valoración del dióxido de carbono producido (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico en recipientes cerrados (ensayo del CO_2 en el espacio de cabeza).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Capítulo C.4 del presente anexo: Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Capítulo C.11 del presente anexo. Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.

▼M4

Apéndice 1

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

CI: Carbono inorgánico.

CO_2Te: Dióxido de carbono teórico (mg); es la cantidad de dióxido de carbono que se calcula que va a producirse a partir del contenido en carbono, conocido o medido, de la sustancia problema cuando se mineraliza completamente; se expresa también como mg de dióxido de carbono producido por mg de sustancia problema.

COD: Carbono orgánico disuelto; es el carbono orgánico presente en solución o el que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros o permanece en el sobrenadante tras centrifugación a aproximadamente 4 000 g (± 40 000 m sec^{-2}) durante 15 minutos.

CID: Carbono inorgánico disuelto.

CITe: Carbono inorgánico teórico.

CIT: Carbono inorgánico total.

Fácilmente biodegradable: Categoría arbitraria de sustancias químicas que han pasado determinados ensayos exploratorios específicos en cuanto a la biodegradabilidad última; estos ensayos son tan estrictos que se acepta que estos compuestos se degradan rápida y completamente en los medios ambientes acuáticos en condiciones aerobias.

Período de observación de 10 días: Son los 10 días que siguen inmediatamente al momento en que se alcanza el 10 % de degradación.

Biodegradabilidad intrínseca: Categoría de sustancias químicas que presentan signos inequívocos de biodegradación (primaria o final) en algún ensayo de biodegradabilidad.

Biodegradación aerobia final: Es el nivel de degradación al que llega la sustancia problema cuando es totalmente utilizada por microorganismos dando lugar a la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

Mineralización: Degradación completa de una sustancia orgánica a CO_2 y H_2O en condiciones aerobias y a CH_4, CO_2 y H_2O en condiciones anaerobias.

Fase de latencia: Tiempo comprendido desde el inicio de un ensayo hasta que se consigue la aclimatación o adaptación de los microorganismos de degradación y llega a un nivel detectable el grado de biodegradación de una sustancia o materia orgánica problema (por ejemplo, hasta el 10 % de la biodegradación teórica máxima, o menos, en función de la exactitud de la técnica de medición).

Fase de degradación: Tiempo transcurrido desde el final de la fase de latencia hasta el momento en que se alcanza el 90 % del nivel máximo de degradación.

Fase de meseta: Fase en la que se ha alcanzado la degradación máxima y se ha aplanado la curva de biodegradación.

Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

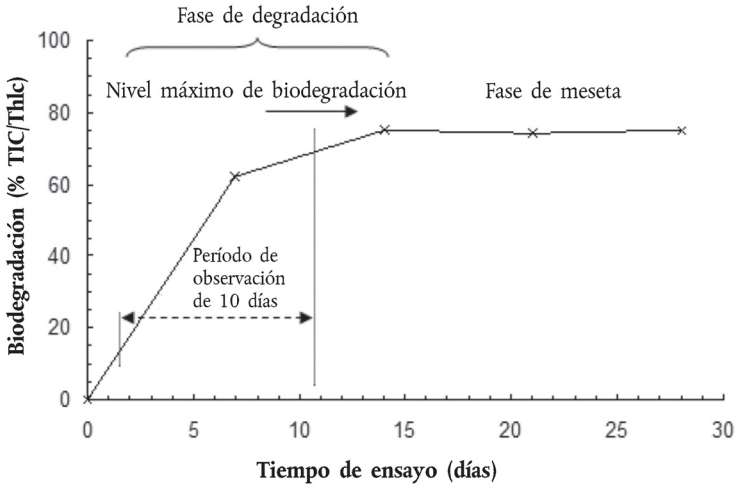
▼M4

Apéndice 2

Ejemplo de curva de biodegradación

Figura 1

Biodegradación del 1-octanol en el ensayo del espacio de cabeza de CO_2



Glosario:

Biodegradación

Fase de degradación

Nivel máximo de biodegradación

Fase de meseta

Período de observación de 10 días

Tiempo de ensayo (días)

▼M4

C.30. **BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS TERRESTRES**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 317 (2010). Entre los métodos de ensayo relativos al destino en el medio ambiente, los denominados Bioconcentración — Ensayo dinámico con peces [capítulo C.13 del presente anexo (49)] y Bioacumulación en oligoquetos bentónicos que viven en los sedimentos (53) se publicaron respectivamente en 1996 y 2008, respectivamente. Extrapolar datos de bioacumulación acuática a los organismos terrestres, como los gusanos de tierra, resulta difícil, si no imposible. Actualmente se utilizan modelos de cálculo basados en la lipofilia de la sustancia problema [por ejemplo, (14) (37)] para la evaluación de la bioacumulación de sustancias en el suelo como, por ejemplo, en el documento de orientación técnica de la UE (19). Ya se ha establecido la necesidad de disponer de un método específico del compartimento [por ejemplo, (55)]. Esto es especialmente importante para la evaluación del envenenamiento secundario en cadenas alimentarias terrestres (4). Varios métodos de ensayo nacionales se refieren a la cuestión de la bioacumulación en organismos diferentes de los peces, como, por ejemplo, (2) y (72). La American Society for Testing and Materials ha elaborado un método para medir la bioacumulación en gusanos de tierra (*Eisenia fetida,* Savigny) y gusanos terrestres del género *Enchytraeus* (3). Un método reconocido internacionalmente para la determinación de la bioacumulación en suelo enriquecido mejorará la evaluación del riesgo que plantean las sustancias para los ecosistemas terrestres [por ejemplo, (25) (29)].

2. Los invertebrados que ingieren suelo están expuestos a las sustancias unidas a este. Entre dichos animales, los oligoquetos terrestres desempeñan una papel importante para la estructura y la función de los suelos (15) (20). Los oligoquetos terrestres viven en el interior del suelo y parcialmente en su superficie (especialmente en la capa de materia orgánica en descomposición); suelen representar las especies más abundantes en términos de biomasa (54). Al remover la tierra y servir de presa estos animales pueden influir mucho en la biodisponibilidad de las sustancias para otros organismos, como predadores invertebrados [por ejemplo, ácaros y escarabajos predadores (64)] o vertebrados [por ejemplo, zorros y gaviotas (18) (62)]. En el apéndice 5 se describen algunas especies de oligoquetos terrestres que se utilizan actualmente en ensayos ecotoxicológicos.

3. La guía ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) proporciona muchos datos fundamentales y útiles para la realización del presente método de ensayo sobre bioacumulación en el suelo. También se hace referencia en el presente método de ensayo al capítulo C.13 del presente anexo (Bioconcentración — Ensayo dinámico con peces) (49) y a las directrices TG 315 de la OCDE (Bioacumulación en oligoquetos bentónicos que viven en los sedimentos) (53). Asimismo, constituyen fuentes principales de información para el presente método de ensayo la experiencia práctica con estudios de bioacumulación en el suelo y las publicaciones de la bibliografía, como, por ejemplo, (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. El método de ensayo es sobre todo aplicable a las sustancias orgánicas neutras y estables, que tienden a adsorberse al suelo. Es posible que este método de ensayo pueda aplicarse en los ensayos de bioacumulación de compuestos organometálicos estables que se asocian al suelo. También es aplicable a los metales y otros oligoelementos.

REQUISITO PREVIO

5. Se han realizado ensayos para medir la bioacumulación en los oligoquetos terrestres en relación con metales pesados [véase por ejemplo (63)] y de sustancias orgánicas persistentes con un valor de log K_{ow} entre 3,0 y 6,0 [véase por ejemplo (40)]. Estos ensayos también son aplicables a:

— las sustancias con un valor de log K_{ow} superior a 6,0 (sustancias superhidrofóbicas),

▼M4

— las sustancias que pertenecen a una clase de sustancias orgánicas de las que se sepa que tienen potencial para bioacumularse en organismos vivos como, por ejemplo, las sustancias tensioactivas o muy adsorbentes,

— las sustancias cuyas características estructurales indican potencial de bioacumulación como, por ejemplo, los análogos de sustancias con potencial de bioacumulación conocido, y

— los metales.

6. Antes de empezar el estudio ha de obtenerse información sobre la sustancia problema, como el nombre común, el nombre químico (de preferencia la denominación IUPAC), la fórmula estructural, el número de registro CAS, la pureza, las precauciones de seguridad, las condiciones adecuadas de conservación y los métodos analíticos. Además, deben conocerse los datos siguientes:

a) hidrosolubilidad;

b) coeficiente de reparto octanol/agua K_{ow};

c) coeficiente de reparto suelo/agua K_{oc};

d) presión de vapor;

e) degradabilidad (por ejemplo, en el suelo, en agua);

f) metabolitos conocidos.

7. Pueden utilizarse sustancias problema tanto con marcado radiactivo como sin él. Sin embargo, para facilitar el análisis se recomienda emplear sustancias problema con marcado radiactivo. La decisión dependerá de los límites de detección o de la necesidad de medir la sustancia problema inicial y sus metabolitos Si se utiliza una sustancia problema con marcado radiactivo y se miden los residuos radiactivos totales, es importante caracterizar estos residuos tanto en el suelo como en los organismos de ensayo en cuanto a los porcentajes de sustancia problema inicial y de otras sustancias marcadas, por ejemplo en muestras tomadas en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción, para poder calcular un factor de bioacumulación (BAF) de la sustancia problema inicial y de sus metabolitos importantes presentes en el suelo (véase el punto 50). Es posible que se tenga que modificar el método aquí descrito como, por ejemplo, para conseguir biomasa suficiente o para medir sustancias problema orgánicas no marcadas radiactivamente o metales. Cuando se miden los residuos radiactivos totales (por recuento de centelleo líquido tras la extracción, combustión o disolución de los tejidos), el factor de bioacumulación se basará en la sustancia problema inicial y en sus metabolitos. El cálculo del BAF se basará preferentemente en la concentración de la sustancia problema inicial en los organismos y en los residuos radiactivos totales. Posteriormente, debe calcularse el factor de acumulación biota-suelo (BSAF), normalizado teniendo en cuenta el contenido de lípidos de los gusanos y el contenido de carbono orgánico (CO) del suelo, a partir del BAF, para permitir comparar los resultados obtenidos con diferentes ensayos de bioacumulación.

8. Debe conocerse la toxicidad de la sustancia problema para la especie utilizada en el ensayo, por ejemplo en forma de concentración con efecto (ECx) o de concentración letal (LCx) por la fase de absorción [por ejemplo, (19)]. Normalmente, la concentración seleccionada de la sustancia problema será aproximadamente del 1 % de su LC_{50} aguda asintótica, y al menos diez veces superior a su límite de detección en el suelo por el método de análisis elegido. Cuando sea posible, se dará prioridad a los valores de toxicidad derivados de estudios a largo plazo con parámetros subletales (51) (52). Si no se dispone de tales datos, un ensayo de toxicidad aguda aportará información útil [véase, por ejemplo, (23)].

▼M4

9. Debe disponerse de un método analítico adecuado, de exactitud, precisión y sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia en las soluciones de ensayo, en el suelo y en el material biológico, así como de datos sobre la preparación y la conservación de las muestras, junto con las fichas de datos de seguridad de los materiales. Es necesario también conocer el límite de detección analítica de la sustancia problema tanto en el suelo como en los tejidos de los gusanos. Si se utiliza una sustancia problema con marcado radiactivo, debe conocerse la radiactividad específica (es decir, en Bq mol^{-1}) y el porcentaje de radiactividad asociada con las impurezas. La radiactividad específica de la sustancia problema debe ser suficentemente elevada para facilitar el análisis, y las concentraciones de ensayo utilizadas no deben provocar efectos tóxicos.

10. El ensayo puede efectuarse con suelo artificial o con suelos naturales. Antes del inicio del ensayo debe disponerse de información sobre las características del suelo natural empleado como, por ejemplo, origen del suelo o sus componentes, pH, contenido de carbono orgánico, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), y capacidad de retención de agua (WHC) (3) (48).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. Entre los parámetros que caracterizan la bioacumulación de una sustancia problema se cuentan el factor de bioacumulación (BAF), la constante de la velocidad de absorción (k_s) y la constante de la velocidad de eliminación (k_e). En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

12. El ensayo se divide en dos fases: la de absorción (exposición) y la de eliminación (post-exposición). Durante la fase de absorción, se exponen al suelo, que se ha enriquecido con la sustancia problema, grupos de gusanos en paralelo (réplicas). Además de los animales de ensayo, se someten a las mismas condiciones pero sin la sustancia problema grupos de gusanos de control. Se miden el peso seco y el contenido de lípidos de los organismos de ensayo. Esto puede hacerse con gusanos del grupo de control. Pueden obtenerse valores analíticos de referencia (blanco) analizando muestras del suelo y de los gusanos de control. Para la fase de eliminación, los gusanos se pasan a un suelo libre de la sustancia problema. Siempre hay que hacer una fase de eliminación, salvo que la absorción de la sustancia problema durante la fase de exposición haya sido insignificante. La fase de eliminación aporta información sobre la velocidad a la que los organismos de ensayo excretan la sustancia problema [por ejemplo, (27)]. Si durante la fase de absorción no se ha llegado a un estado de equilibrio, es preferible que la determinación de los parámetros cinéticos (factor de bioacumulación cinético, BAFk) y las constantes de velocidad de absorción y de eliminación se base en el ajuste simultáneo de los resultados de las fases de absorción y de eliminación. La concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de los gusanos es objeto de seguimiento a lo largo de ambas fases del ensayo.

13. Durante la fase de absorción, se efectúan mediciones a los tiempos de muestreo hasta 14 días (enquitreidos) o 21 días (gusanos de tierra) hasta que se alcance el estado de equilibrio (11) (12) (67). El estado de equilibrio se alcanza cuando una representación de la concentración en los gusanos frente al tiempo es paralela al eje del tiempo, y tres análisis sucesivos de la concentración efectuados con muestras tomadas a intervalos de al menos dos días no muestran una diferencias entre sí superiores al ± 20 % sobre la base de comparaciones estadísticas (por ejemplo, análisis de varianza, análisis de regresión).

14. La fase de eliminación consiste en transferir los organismos de ensayo a recipientes que contienen el mismo sustrato pero sin la sustancia problema. Durante la fase de eliminación, se llevan a cabo mediciones a los tiempos de muestreo durante 14 días (enquitreidos) o 21 días (gusanos de tierra) salvo que en alguna determinación analítica se ponga antes de manifiesto que se ha llegado a una reducción del 90 % de los residuos de la sustancia problema en los gusanos. La concentración de la sustancia problema en los gusanos al final de la fase de eliminación se registra como residuos no

▼M4

eliminados. El factor de bioacumulación en el estado de equilibrio (BAFss) se calcula de preferencia como la proporción de la concentración en gusanos (Ca) y en el suelo (Cs) en el estado de equilibrio aparente, y también como factor de bioacumulación cinético (BAFk) que es la proporción entre la constante de la velocidad de absorción desde el suelo (k_s) y la constante de la velocidad de eliminación (k_e) (véanse las definiciones en el apéndice 1), aceptando que la cinética es de orden 1 (véanse los cálculos en el apéndice 2). En caso de que claramente no pueda aplicarse la cinética de primer orden, será necesario emplear otros modelos.

15. La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de eliminación (o constantes, cuando participen otros modelos), el factor de bioacumulación cinético (BAFk) y, cuando sea posible, los límites de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir de ecuaciones modelo con ayuda de ordenador (véanse orientaciones en el apéndice 2). La adecuación del ajuste de cualquier modelo puede determinarse a partir de, por ejemplo, el coeficiente de correlación o del coeficiente de determinación (si los coeficientes están próximos a la unidad, es que la adecuación es buena) o con la prueba de ji cuadrado. También puede ser indicativo de la calidad del ajuste del modelo el orden del error típico o el límite de confianza alrededor de los parámetros estimados.

16. Para reducir la variabilidad de los resultados de los ensayos de sustancias problema con elevada lipofilia, los factores de bioacumulación deben expresarse en relación con el contenido de lípidos y el contenido de carbono orgánico (kg de carbono orgánico en el suelo/kg de contenido de lípidos en los gusanos). Este enfoque se basa en el hecho de que, con algunos tipos de sustancias químicas, hay una clara relación entre el potencial de bioacumulación y la lipofilia; esto está bien demostrado en peces (47). Hay una relación entre el contenido en lípidos de los peces y la bioacumulación de tales sustancias. Se han encontrado correlaciones similares en los organismos bentónicos [véanse, por ejemplo, (30) (44)]. Análogamente se ha demostrado esta correlación en el caso de los oligoquetos terrestres [véanse por ejemplo (5) (6) (7) (14)]. Si se dispone de suficiente tejido de gusanos, puede determinarse el contenido en lípidos de los animales de ensayo con el mismo material biológico que se utilice para determinar la concentración de la sustancia problema. Otra posibilidad es utilizar los animales de control para medir el contenido en lípidos.

VALIDEZ DEL ENSAYO

17. Para que un ensayo sea válido, deben cumplir los siguientes criterios tanto los grupos de control como los de tratamiento:

— Al final del ensayo, la mortalidad general durante las fases de absorción y de eliminación no debe superar el 10 % (gusanos de tierra) o el 20 % (enquitreidos) del número total de gusanos introducidos.

— Respecto a *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, la pérdida media de masa medida al final de la fase de absorción y al final de la fase de eliminación no debe superar el 20 % respecto al peso fresco (pf) al inicio de cada fase.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Especies de ensayo

18. Para el ensayo de bioacumulación se recomienda emplear varias especies de oligoquetos terrestres. Las especies *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (Lumbricidae), o *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus,* o *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae), que son las más frecuentemente utilizadas, se describen en el apéndice 5.

▼M4

Equipo

19. Se tendrá cuidado de no utilizar, con ninguna parte del equipo, materiales que puedan disolver o adsorber la sustancia problema o lixiviar otras sustancias, o tener algún efecto adverso sobre los animales de ensayo. Pueden utilizarse recipientes normales rectangulares o cilíndricos, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adecuada para la tasa de carga, es decir, para el número de gusanos de ensayo. Para los equipos que estén en contacto con los medios de ensayo pueden utilizarse acero inoxidable, plástico o vidrio. Los recipientes de ensayo deben estar cubiertos de forma adecuada para evitar que se escapen los gusanos, pero permitiendo que entre suficiente aire. En el caso de sustancias con elevados coeficientes de adsorción, como los piretroides sintéticos, puede ser necesario emplear vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados (49). Debe evitarse que se escapen las sustancias problema con marcado radiactivo y también las sustancias volátiles. Deben emplearse trampas (por ejemplo, frascos lavadores de gas, de vidrio) con absorbentes adecuados para retener los eventuales residuos que se evaporen de los recipientes de ensayo.

Suelo

20. El suelo de ensayo debe ser tal que permita la supervivencia y, preferentemente, la reproducción de los organismos de ensayo durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan comportamientos ni aspectos anormales en los animales. Los gusanos deben enterrarse en el suelo.

21. Se recomienda para usarlo como sustrato de los ensayos el suelo artificial descrito en el capítulo C.8 del presente anexo (48). En el apéndice 4 se explica la preparación del suelo artificial para emplearlo en los ensayos de acumulación, y se dan recomendaciones para su almacenamiento. El suelo artificial secado al aire puede conservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

22. Sin embargo, como suelo para el ensayo o para el cultivo de los gusanos pueden emplearse suelos naturales procedentes de lugares exentos de contaminación. Los suelos naturales deben caracterizarse al menos por su origen (lugar de recogida), pH, contenido de carbono orgánico, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), capacidad de retención de agua máxima del suelo (WHCmax), y contenido porcentual de agua (3). El análisis del suelo o de sus componentes para detectar microcontaminantes antes de la utilización debe aportar información útil. Si se utiliza suelo de campo de tierras agrícolas, no debe haberse tratado con productos fitosanitarios ni haberse fertilizado con estiércol de animales tratados durante al menos un año ni con fertilizantes orgánicos durante al menos seis meses antes del muestreo (50). En la referencia 3 se describen los procedimientos de manipulación de los suelos naturales antes de su empleo en los ensayo de ecotoxicología con oligoquetos en laboratorio. El período de almacenamiento de los suelos naturales en el laboratorio debe ser lo más breve posible.

Aplicación de la sustancia problema

23. La sustancia problema se incorpora al suelo. Hay que tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema. Las sustancias problema hidrosolubles deben disolverse completamente en agua antes de mezclarse con el suelo. El procedimiento de enriquecimiento del suelo con sustancias problema poco hidrosolubles implica el recubrimiento de uno o varios de los componentes del suelo (artificial) con la sustancia problema. Por ejemplo, la arena de cuarzo, o una porción de la misma, puede sumergirse en una solución de la sustancia problema en un disolvente orgánico adecuado, que se evapora lentamente después hasta sequedad. La fracción recubierta puede mezclarse a continuación con el suelo húmedo. La ventaja principal de este procedimiento es que no se introduce ningún disolvente en

▼M4

el suelo. Cuando se utiliza suelo natural, la sustancia problema puede añadirse introduciéndola en una porción de suelo secada al aire como se describe más arriba respecto al suelo artificial, o agitando la sustancia problema en el suelo húmedo, con una fase posterior de evaporación si se utiliza agente solubilizante. En general, debe evitarse el contacto del suelo húmedo con los disolventes, en la medida de lo posible. Deben considerarse los elementos siguientes (3):

— Si se utiliza un disolvente distinto del agua, debe ser uno miscible con esta y/o que pueda extraerse (por ejemplo, mediante evaporación), para dejar en el suelo solamente la sustancia problema.

— Si se utiliza un control del disolvente, no es necesario emplear un control negativo. El control del disolvente debe contener la máxima concentración de disolvente que se haya añadido al suelo y hay que utilizar disolvente del mismo lote empleado para hacer la solución madre. Los principales criterios para la selección de un agente solubilizante adecuado deben ser la toxicidad y la volatilidad del disolvente, y la solubilidad de la sustancia problema en el disolvente elegido.

24. En el caso de sustancias poco solubles en agua y en disolventes orgánicos, es posible mezclar (por ejemplo, utilizando un mortero) entre 2,0 y 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo con la cantidad de sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo deseada. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo previamente humedecido y se mezcla completamente con la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener el contenido necesario de humedad. La mezcla final se reparte en los recipientes de ensayo. Se repite el procedimiento con cada concentración de ensayo, y se prepara asimismo un control adecuado con 2,0 – 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo.

25. Debe determinarse la concentración de la sustancia problema en el suelo tras su adición a este. Ha de verificarse que la sustancia problema está distribuida de forma homogénea en el suelo antes de introducir los organismos de ensayo. Hay que indicar el método utilizado para añadir la sustancia problema y los motivos de la elección del procedimiento concreto (24).

26. Lo ideal es que se establezca el equilibrio entre el suelo y la fase de agua intersticial antes de añadir los organismos; se recomienda dejar un tiempo de cuatro días a 20 °C. Con muchas sustancias orgánicas poco hidrosolubles, el plazo necesario para alcanzar un equilibrio verdadero entre las fracciones adsorbidas y las disueltas puede ser del orden de días o de meses. En función del objeto del estudio, por ejemplo cuando se pretende simular las condiciones ambientales, el suelo al que se ha añadido la sustancia puede "envejecerse" durante un plazo mayor como por ejemplo, en el caso de los metales, de tres semanas a 20 °C (22).

Cultivo de los organismos de ensayo

27. Es preferible mantener los gusanos en cultivos de laboratorio permanentes. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre los métodos de cultivo en laboratorio de *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei,* así como de especies de enquitreidos [véanse también (48) (51) (52)].

28. Los gusanos utilizados en los ensayos deben estar libres de enfermedades, anomalías y parásitos observables.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

29. Los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema durante la fase de absorción, la cual debe durar 14 días (con los enquitreidos) o 21 días (con los gusanos de tierra), salvo que se demuestre que se ha alcanzado el estado de equilibrio.

▼M4

30. Para la fase de eliminación, los gusanos se pasan a un suelo libre de la sustancia problema. La primera muestra debe tomarse a las 4 – 24 h tras el inicio de la fase de eliminación. En el apéndice 3 se dan ejemplos de planes de muestreo con una fase de absorción de 21 días y una fase de eliminación también de 21 días.

Organismos de ensayo

31. En muchas especies de enquitreidos terrestres, el peso de cada individuo es muy bajo (por ejemplo, de 5-10 mg de peso húmedo por individuo de *Enchytraeus albidus* y aún menos en el caso de *Enchytraeus crypticus* o de *Enchytraeus luxuriosus*); a fin de efectuar las mediciones del peso y el análisis químico, puede ser necesario agrupar los gusanos de los recipientes de ensayo replicados (es decir, todos los gusanos de un recipiente replicado se utilizarán para obtener un solo resultado de los tejidos analizados). A cada recipiente replicado se añaden 20 individuos de enquitreidos, y se utilizan al menos tres réplicas. Si el límite de detección analítica de la sustancia problema es elevado, puede ser necesario emplear más gusanos. Cuando se trate de especies de ensayo con mayor peso individual (*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*), pueden emplearse recipientes replicados con un solo individuo.

32. Los gusanos de tierra empleados en un ensayo deben tener pesos similares (por ejemplo, los individuos de *Eisenia fetida* y de *Eisenia andrei* deben tener un peso de 250 – 600 mg). Los enquitreidos (por ejemplo, *Enchytraeus albidus*) deben tener una longitud aproximada de 1 cm. Todos los gusanos utilizados en un ensayo concreto deben proceder de la misma fuente, y ser adultos con clitelo (véase el apéndice 5). Ya que el peso y la edad de un animal pueden afectar a los valores del BAF (por ejemplo, debido a las variaciones en el contenido de lípidos o a la presencia de huevos), estos parámetros deben registrarse con exactitud y tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados. Además, pueden depositarse capullos durante el período de exposición, lo que también afecta a los valores del BAF. Se recomienda pesar una submuestra de la población de gusanos de ensayo antes del ensayo, para calcular el peso medio, tanto seco como húmedo.

33. Debe ser elevada la proporción de suelo respecto a los gusanos, para minimizar la disminución de la concentración de la sustancia problema en el suelo durante la fase de absorción. Con *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* se recomienda una cantidad mínima de 50 g de peso seco (p.s.) de suelo por gusano; con enquitreidos, la recomendación es de un mínimo de 10-20 g p.s. de suelo por recipiente de ensayo. Los recipientes deben contener una capa de suelo de 2-3 cm (enquitreidos) o 4-5 cm (gusanos de tierra).

34. Los gusanos empleados en un ensayo se toman del cultivo (por ejemplo, en el caso de los entriqueidos utilizando unas pinzas de joyero). Se transfieren animales adultos a un suelo de ensayo no tratado para su aclimatación, y se les da comida (véase el punto 36). Si las condiciones de ensayo son diferentes de las condiciones de cultivo, debe ser suficiente una fase de aclimatación de 24 – 72 h para que los gusanos se adapten a las condiciones de ensayo. Tras su aclimatación, los gusanos de tierra se lavan transfiriéndolos a placas de vidrio (por ejemplo, placas Petri) que contengan agua limpia, y después se pesan antes de añadirlos al suelo de ensayo. Antes de hacer la pesada, debe retirarse el exceso de agua de los gusanos, poniéndolos suavemente contra el borde de la placa o secándolos con precaución con una servilleta de papel humedecida ligeramente.

35. Debe observarse y registrarse la conducta de enterramiento de los organismos de ensayo. En los ensayos con gusanos de tierra, los animales (de control y de tratamiento) se entierran normalmente en el suelo en el plazo de unas pocas horas; ha de comprobarse que esto es así en el plazo máximo de 24 h tras la adición de los gusanos a los recipientes de ensayo. Si los gusanos no se entierran en el suelo (por ejemplo, hay más del 10 % de gusanos que no se entierran a lo largo de más de la mitad de la fase de

▼M4

absorción), puede ser que las condiciones de ensayo no sean adecuadas o bien que los organismos de ensayo no estén sanos. En tal caso, es necesario parar el ensayo y repetirlo. Los enquitreidos viven principalmente en los poros intersticiales del suelo, y con frecuencia su tegumento puede estar en contacto tan solo parcial con el sustrato que lo rodea; se acepta que la exposición de los enquitreidos enterrados y no enterrados es equivalente, y el que estos animales no se entierren no implica necesariamente que deba repetirse el ensayo.

Alimentación

36. Debe preverse dar alimento a los animales cuando se utilice un suelo con bajo contenido de carbono orgánico total. Si se utiliza suelo artificial, se recomienda una tasa de alimentación semanal (es decir, los gusanos se alimentan una vez por semana) de 7 mg de estiércol seco por gramo de suelo en peso seco para los gusanos de tierra, y una tasa semanal de 2 – 2,5 mg de copos de avena molidos por gramo de suelo en peso seco para los enquitreidos (11). La primera ración de alimento debe mezclarse con el suelo justo antes de que se añadan los organismos de ensayo. Es preferible utilizar el mismo de tipo de alimento que en los cultivos (véase el apéndice 5).

Luz y temperatura

37. Los ensayos deben efectuarse con un ciclo controlado de 16/8 horas de luz/oscuridad, con un nivel de iluminación preferentemente de 400 a 800 lx en la zona de los recipientes de ensayo (3). La temperatura de ensayo debe ser de 20 ± 2 °C en toda la duración.

Concentraciones de ensayo

38. Se utiliza una única concentración. Deben justificarse las situaciones en que sea necesario añadir una o varias concentraciones más. Si la toxicidad (EC_x) de la sustancia problema está próxima al límite de detección analítica, se recomienda utilizar sustancias problema con marcado radiactivo de elevada radiactividad específica. En el caso de los metales, la concentración debe ser superior al nivel de fondo de los tejidos y del suelo.

Réplicas

39. Para las mediciones cinéticas (fases de absorción y de eliminación), el número mínimo de réplicas de recipientes tratados debe ser de tres por punto de muestreo. El número total de réplicas preparadas debe ser suficiente para todos los puntos de muestreo previstos de las fases de absorción y de eliminación.

40. Para las observaciones y mediciones biológicas (por ejemplo, relación entre peso seco y peso húmedo, contenido de lípidos) y para el análisis de las concentraciones de fondo en los gusanos y el suelo, deben preverse al menos 12 recipientes replicados de un control negativo (cuatro muestreados al inicio, cuatro al final de la fase de absorción y cuatro al final de la fase de eliminación) si no se utiliza ningún disolvente distinto del agua. Si se emplea algún agente solubilizante para la aplicación de la sustancia problema, debe utilizarse, además de las réplicas tratadas, un control del disolvente (cuatro recipientes de ensayo muestreados al inicio, cuatro al final de la fase de absorción y cuatro al final de la fase de eliminación) con todos los componentes salvo la sustancia problema. En este caso, pueden prepararse otros cuatro recipientes adicionales de un control negativo (sin disolvente) para permitir un muestreo opcional al final de la fase de absorción. Estas réplicas pueden compararse biológicamente con el control de disolvente para obtener información en cuanto a la posible influencia del disolvente sobre los organismos de ensayo. Se recomienda preparar un número suficiente de recipientes adicionales de reserva (por ejemplo, ocho) añadidos a los de tratamiento y de control.

▼M4

Frecuencia de las mediciones de la calidad del suelo

41. Al inicio y al final de las fases de absorción y de eliminación deben medirse el pH del suelo, el contenido de humedad del suelo y (continuamente) la temperatura de la sala del ensayo. Una vez por semana debe controlarse el contenido de humedad del suelo pesando los recipientes de ensayo y comparando los pesos medidos en cada momento con los pesos iniciales del comienzo del ensayo. Las pérdidas de agua deben compensarse añadiendo agua desionizada.

Muestreo y análisis de los gusanos y del suelo

42. En el apéndice 3 se encuentra un ejemplo de plan para las fases de absorción y de eliminación de los ensayos de bioacumulación en gusanos de tierra y en enquitreidos.

43. Se toman muestras del suelo de los recipientes de ensayo para la determinación de la concentración de la sustancia problema antes de introducir los gusanos, y durante las fases de absorción y de eliminación. Durante el ensayo se determinan las concentraciones de la sustancia problema en los gusanos y en el suelo. En general, se miden las concentraciones totales en el suelo. Como opción pueden medirse las concentraciones en el agua intersticial; en tal caso, hay que aportar la justificación e indicar los métodos adecuados, antes del inicio del estudio, e incluir estos datos en el informe.

44. Se toman muestras de los gusanos y del suelo al menos en seis ocasiones durante las fases de absorción y de eliminación. Si se demuestra la estabilidad de la sustancia problema, puede reducirse el número de análisis del suelo. Se recomienda analizar al menos tres réplicas al inicio y al final de la fase de absorción. Si la concentración en el suelo medida al final de la fase de absorción se desvía de la concentración inicial en más del 30 %, será necesario analizar también las muestras de suelo en otras fechas.

45. En cada punto de muestreo se extraen los gusanos del suelo de una réplica dada (por ejemplo, después de extender el suelo de la réplica en una bandeja poco profunda, utilizando pinzas de joyero blandas) y se lavan rápidamente con agua en una bandeja poco profunda de vidrio o de acero. Se retira el exceso de agua (véase el punto 34). Se transfieren los gusanos con cuidado a un recipiente tarado y se pesan inmediatamente, incluido el contenido intestinal.

46. A continuación hay que dejar que los gusanos de tierra (*Eisenia* sp.) se purguen del contenido intestinal durante una noche, por ejemplo, en un papel de filtro húmedo puesto en una placa Petri cerrada (véase el punto 34). Tras la purga, debe determinarse el peso de los gusanos para evaluar una posible disminución de la biomasa durante el ensayo (véanse los criterios de validez en el punto 17). La pesada y el análisis tisular de los enquitreidos se efectúan sin purgar, ya que tales operaciones resultan difíciles técnicamente debido al pequeño tamaño de estos gusanos. Tras la determinación final del peso, los gusanos se matan inmediatamente, utilizando el método más adecuado (por ejemplo, con nitrógeno líquido, o congelando por debajo de – 18 °C).

47. Durante la fase de eliminación, los gusanos van sustituyendo por suelo limpio el contenido intestinal contaminado. Esto significa que las mediciones de gusanos sin purgar (enquitreidos en este contexto) muestreados justo antes de la fase de eliminación incluyen el suelo contaminado presente en el intestino. Respecto a los oligoquetos acuáticos se acepta que, tras las primeras 4-24 h de la fase de eliminación, la mayor parte del contenido intestinal contaminado ha sido sustituido por sedimento limpio [véase, por ejemplo, (46)]. Se han comunicado observaciones similares en relación con los gusanos de tierra en estudios sobre la acumulación de cadmio y zinc radiomarcados (78). En los enquitreidos no purgados, la concentración de esta primera muestra de la fase de eliminación puede considerarse como la concentración tisular tras la purga intestinal. Para tener en cuenta la dilución de la concentración de la sustancia problema por el suelo no contaminado durante la fase de eliminación, es posible estimar el peso del contenido intestinal a partir de la relación entre el peso húmedo de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos, o de la relación entre el peso seco de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos.

▼M4

48. Es preferible analizar las muestras de suelo y de gusanos inmediatamente después de haberlas tomado (es decir, en el plazo de 1 o 2 días) para evitar la degradación y otras pérdidas, y se recomienda calcular las velocidades aproximadas de absorción y de eliminación según se va llevando a cabo el ensayo. Si se retrasa el análisis, las muestras deben conservarse siguiendo un método adecuado como, por ejemplo, mediante congelación (≤ –18 °C).

49. Hay que comprobar que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia problema de las muestras de suelo y de gusanos, son satisfactorias para el método considerado; deben indicarse la eficiencia de la extracción, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Análogamente hay que comprobar que la sustancia problema no es detectable en los recipientes de control a concentraciones superiores a la de fondo. Cuando la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo Ca es > 0 en los gusanos de control, debe incluirse en el cálculo de los parámetros cinéticos (véase el apéndice 2). Todas las muestras deben manipularse a lo largo de todo el ensayo de manera que se minimicen la contaminación y las pérdidas (por ejemplo, derivadas de la adsorción de la sustancia problema al dispositivo de muestreo).

50. Cuando se trabaja con sustancias problema radiomarcadas, es posible analizar la sustancia original y sus metabolitos. La cuantificación de la sustancia problema original y de sus metabolitos en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción proporciona importante información. Las muestras deben "limpiarse" después, de manera que pueda cuantificarse aparte la sustancia problema original. Si alguno de los distintos metabolitos supera el 10 % de la radiactividad total de la muestra o muestras analizadas, se recomienda identificarlo.

51. Hay que registrar y comunicar la recuperación total y la recuperación de la sustancia problema en gusanos, suelo y, si se utilizan, trampas que contengan absorbentes para retener la sustancia problema evaporada.

52. Es aceptable mezclar los individuos muestreados de un recipiente de ensayo dado en el caso de los enquitreidos, que son más pequeños que los gusanos de tierra. Si esa mezcla implica reducir el número de réplicas, quedan limitados los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si se necesitan un procedimiento y una potencia estadística específica, convendrá entonces utilizar en el ensayo un número adecuado de recipientes de ensayo replicados, para conciliar la mezcla con el procedimiento y la potencia deseados.

53. Se recomienda expresar el BAF tanto en función del peso seco total como, cuando se requiera (es decir, en el caso de las sustancias muy hidrofóbicas), en función del contenido lipídico. Deben aplicarse métodos adecuados para la determinación del contenido lipídico; a este propósito deben adaptarse algunos métodos existentes, véase por ejemplo (31) (58). Estos métodos aplican una técnica de extracción con cloroformo/metanol. Sin embargo, para evitar el uso de disolventes clorados debe utilizarse una modificación del método de Bligh y Dyer (9), como se describe en (17). Los diversos métodos pueden no dar valores idénticos, por lo que es importante precisar bien el método utilizado. Lo ideal es hacer el análisis de los lípidos, cuando sea posible (es decir, si se dispone de suficiente tejido de gusanos), con la misma muestra o extracto que se haya utilizado para el análisis de la sustancia problema, puesto que los lípidos deben a menudo retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía (49). Otra posibilidad es utilizar animales del control para medir el contenido lipídico, el cual puede servir para normalizar los valores del BAF. Este último planteamiento reduce la contaminación del equipo con la sustancia problema.

▼M4

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

54. La curva de absorción de la sustancia problema se obtiene representando gráficamente su concentración en la superficie o el interior de los gusanos durante la fase de absorción en función del tiempo, con una escala aritmética. Cuando la curva ha alcanzado la fase de meseta, o un estado de equilibrio (véanse las definiciones en el apéndice 1), el factor de bioacumulación en el estado de equilibrio (BAFss) se calcula con ayuda de la fórmula siguiente;

$$\frac{C_a \text{ en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción (media)}}{C_s \text{ en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción (media)}}$$

C_a es la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo

C_s es la concentración de la sustancia problema en el suelo

55. Si no se alcanza el estado de equilibrio, debe determinarse el BAFk, a partir de las constantes de velocidad, en lugar del BAFss, como se describe a continuación:

— Determinar el factor de acumulación (BAFK) como la relación ks/ke.

— Es preferible calcular simultáneamente las constantes de absorción y de eliminación (véase la ecuación 11 del apéndice 2).

— La constante de la velocidad de eliminación (k_e) se calcula normalmente a partir de la curva de eliminación (es decir, la gráfica de la concentración de la sustancia problema en los gusanos durante la fase de eliminación). A continuación se calcula la constante de la velocidad de absorción k_s a partir de k_e y del valor de C_a derivado de la curva de absorción; véase en el apéndice 2 una descripción de estos métodos. Para obtener el factor de bioconcentración BAFK y las constantes de velocidad k_s y k_e se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales. En caso de que la eliminación claramente no siga una cinética de primer orden, será necesario emplear otros modelos más complejos.

Informe del ensayo

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— Toda la información disponible sobre la toxicidad aguda o a largo plazo (por ejemplo EC_x, LC_x, NOEC) de la sustancia problema respecto a los oligoquetos que viven en el suelo.

— Pureza, naturaleza física y propiedades fisicoquímicas como, por ejemplo, log K_{ow}, hidrosolubilidad.

— Datos de identificación química, fuente de la sustancia problema, identidad y concentración de los eventuales disolventes utilizados.

— Si se utilizan sustancias problema radiomarcadas, la posición precisa de los átomos marcados, la radiactividad específica y la pureza radioquímica.

Especie de ensayo:

— Denominación científica, cepa, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, rango de tamaños, etc.

▼M4

Condiciones de ensayo:

— Procedimiento de ensayo seguido.

— Tipo y características del alumbrado y del fotoperíodo o fotoperíodos utilizados.

— Diseño del ensayo (por ejemplo, número y tamaño de los recipientes de ensayo, masa de suelo y altura de la capa de suelo, número de réplicas, número de gusanos por réplica, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y eliminación, frecuencia del muestreo).

— Justificación de la elección del material de los recipientes de ensayo.

— Método de preparación y aplicación de la sustancia problema, así como motivos para elegir un método específico.

— Concentraciones de ensayo nominales, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo, y método de obtención de estos valores.

— Fuente de los componentes del suelo artificial o, si se utilizan medios naturales, origen del suelo, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de los controles (supervivencia, desarrollo de la biomasa, reproducción), características del suelo (pH, contenido de carbono orgánico total, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), WHCmax, contenido porcentual de agua al inicio y al final del ensayo, y otras mediciones realizadas eventualmente).

— Información pormenorizada sobre el tratamiento de las muestras de suelo y de gusanos, incluidos datos de preparación, almacenamiento, adición de la sustancia problema, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia problema en los gusanos y en el suelo y del contenido lipídico (si se mide), y recuperaciones de la sustancia problema.

Resultados:

— Mortalidad de los gusanos de control y de los gusanos de cada recipiente de ensayo, y eventuales comportamientos anormales observados (por ejemplo, evitación del suelo, ausencia de reproducción en un ensayo de bioacumulación con enquitreidos).

— Relación de peso seco a peso húmedo del suelo y de los organismos del ensayo (útil a efectos de normalización).

— Pesos húmedos de los gusanos a cada punto temporal de muestreo; en el caso de los gusanos de tierra, los pesos húmedos al inicio del ensayo y a cada punto temporal de muestreo antes y después de la purga intestinal.

— El contenido lipídico de los organismos de ensayo (si se determina).

— Curvas que indiquen las cinéticas de absorción y de eliminación de la sustancia problema en los gusanos y el tiempo hasta alcanzar el estado de equilibrio.

— C_a y C_s (con desviación típica y bandas, en caso adecuado) a todos los puntos temporales de muestreo (C_a expresada g kg^{-1} de peso húmedo y seco de cuerpo completo, C_s expresada en g kg^{-1} de peso húmedo y seco de suelo); si se necesita conocer el factor de acumulación biota-suelo (BSAF) (por ejemplo, a efectos de comparación de los resultados de dos o más ensayos realizados con animales de diferente contenido lipídico), C_a puede expresarse además en g kg^{-1} de contenido lipídico del organismo, y C_s puede expresarse en g kg^{-1} de carbono orgánico del suelo.

— BAF (expresado en kg de suelo·kg^{-1} de gusanos), constante de la velocidad de absorción del suelo k_s (expresada en g de suelo kg^{-1} de gusanos $día^{-1}$), y constante de la velocidad de eliminación k_e (expresada en $día^{-1}$); también puede indicarse adicionalmente el BSAF (expresado en kg de CO del suelo kg^{-1} de contenido lipídico de los gusanos).

▼M4

— Los siguientes parámetros, si se miden: porcentajes de sustancia original, metabolitos, y residuos ligados (es decir, porcentaje de sustancia problema que no puede extraerse con métodos comunes de extracción) detectados en el suelo y en los animales de ensayo.

— Métodos utilizados para los análisis estadísticos de los datos.

Evaluación de los resultados:

— Cumplimiento de los resultados con los criterios de validez recogidos en el punto 17,

— resultados imprevistos o poco usuales como, por ejemplo, eliminación incompleta de la sustancia problema de los animales de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid potworm Enchytraeus albidus. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation-New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (Eisenia andrei): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (Eisenia andrei): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (Eisenia andrei). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus Enchytraeus. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R & D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes Enchytraeus luxuriosus and Enchytraeus albidus (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm Eisenia fetida. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión (DO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R & D No.: 204 67 458: 149 pp. Puede descargarse en la dirección: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von g-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm Lumbricus rubellus (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF-Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes en lombrices (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción.

(36) Jaenike J (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in Eisenia andrei (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, De-Jong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (Eisenia andrei, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, Eisenia andrei (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in Lumbricus rubellus under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegates. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(49) Capítulo C.13 del presente anexo. Bioconcentración: Ensayo dinámico con peces.

(50) Capítulo C.21 del presente anexo. Microorganismos del suelo: Ensayo de transformación del nitrógeno.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm Eisenia fetida. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). Enchytraeus luxuriosus sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation-Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm Eisenia fetida (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm Lumbricus rubellus exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Apéndice 1

DEFINICIONES

Bioacumulación es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo respecto a la concentración de esta sustancia en el medio ambiente. La bioacumulación es el resultado de procesos tanto de bioconcentración como de biomagnificación (véase más abajo).

Bioconcentración es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado de la absorción de la sustancia solo a partir del medio circundante (es decir, a través de la superficie corporal y del suelo ingerido), respecto a la concentración de esta sustancia en el medio circundante.

Biomagnificación es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado de la absorción a través de comida o presas contaminadas, respecto a la concentración de esta sustancia en la comida o en la presa. La biomagnificación puede provocar la transferencia o la acumulación de la sustancia dentro de redes alimentarias.

La **eliminación** de una sustancia problema es la pérdida de esta sustancia por parte del tejido del organismo de ensayo por procesos activos o pasivos que se producen independientemente de la presencia o ausencia de la sustancia en el medio circundante.

El **factor de bioacumulación** (BAF) en cualquier momento de la fase de absorción de este ensayo de bioacumulación es la concentración de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo (C_a en $g \cdot kg^{-1}$ de peso seco de gusanos) dividida por la concentración de la sustancia en el medio circundante (C_s en $g \cdot kg^{-1}$ de peso seco de suelo); la unidad del BAF es el kg de suelo$\cdot kg^{-1}$ de gusanos.

El **factor de bioacumulación en el estado de equilibrio** (BAF_{ss}) es el BAF en dicho estado y no cambia significativamente a lo largo de un período prolongado de tiempo, durante el cual se mantiene constante la concentración de la sustancia problema en el medio circundante (C_s en $g.kg^{-1}$ de peso seco de suelo).

Los **factores de bioacumulación** calculados directamente a partir de la relación entre la constante de la velocidad de absorción del suelo y la constante de la velocidad de eliminación (k_s y k_e, véase más adelante) se denominan factores de bioacumulación cinéticos (BAF_K).

El **factor de acumulación biota-suelo** (BSAF) es la concentración (normalizada teniendo en cuenta el contenido lipídico) de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo, dividida entre la concentración (normalizada teniendo en cuenta el contenido de carbono orgánico) de la sustancia problema en el suelo en el estado de equilibrio. C_a se expresa entonces en $g \cdot kg^{-1}$ de contenido lipídico del organismo, y C_s en $g \cdot kg^{-1}$ de carbono orgánico del suelo; la unidad del BSAF es el kg de carbono orgánico$\cdot kg^{-1}$ de lípidos.

La **meseta** o el **estado de equilibrio** se define como el equilibrio entre los procesos de absorción y de eliminación que se dan simultáneamente durante la fase de exposición. La fase de equilibrio se alcanza en la representación gráfica del BAF frente al tiempo cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos del BAF realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del ± 20 % entre sí, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres puntos temporales de muestreo. Si las sustancias problema se absorben con lentitud, es más apropiado que los intervalos sean semanales (49).

El **coeficiente de reparto carbono orgánico-agua** (K_{oc}) es la relación de la concentración de una sustancia en la fracción de carbono orgánico de un suelo respecto a su concentración en el agua, en equilibrio.

El **coeficiente de reparto octanol-agua** (K_{ow}) es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio; también se denomina P_{ow}. El logaritmo de K_{ow} (log K_{ow}) se utiliza como indicación del potencial de bioacumulación de una sustancia por los organismos acuáticos.

▼**M4**

La **fase de absorción o de exposición** es el tiempo durante el cual los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema.

La **constante de la velocidad de absorción del suelo** (k_s) es el valor numérico que define la velocidad del aumento de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo debido a la absorción desde la fase del suelo. k_s se expresa en g de suelo kg^{-1} de gusanos d^{-1}.

La **fase de eliminación** es el tiempo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio contaminado a un medio exento de la sustancia problema, durante el cual se estudia la eliminación (o la pérdida neta) de la sustancia por los organismos de ensayo.

La **constante de la velocidad de eliminación** (k_e) es el valor numérico que define la velocidad de reducción de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio que contiene la sustancia problema hacia un medio exento de ella; k_e se expresa en d^{-1}.

Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M4

Apéndice 2

Cálculo de los parámetros de absorción y de eliminación

El parámetro principal del ensayo de bioacumulación es el factor de bioacumulación, el BAF. El BAF medido puede calcularse dividiendo la concentración en el organismo de ensayo, C_a, por la concentración en el suelo, C_s, en el estado de equilibrio. Si no se alcanza el estado de equilibrio durante la fase de absorción, en lugar del BAFss se calcula el BAF_K a partir de las constantes de velocidad. Sin embargo, ha de señalarse si el BAF se refiere o no a las concentraciones en el estado de equilibrio.

El medio usual de obtener el factor de bioacumulación cinético (BAF_K), la constante de la velocidad de absorción del suelo (k_s) y la constante de la velocidad de eliminación (k_e) es emplear métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales, por ejemplo siguiendo los modelos descritos en (68). Dado un conjunto de datos secuenciales de concentración en el tiempo y las ecuaciones del modelo:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 1]}$$

o

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuación 2]}$$

donde:

C_a = concentración de sustancia en los gusanos [g kg^{-1} de peso húmedo o seco]

k_s = constante de la velocidad de absorción en los tejidos [g de suelo kg^{-1} de gusanos d^{-1}]

C_a = concentración de sustancia en el suelo [g kg^{-1} de peso húmedo o seco]

k_e = constante de la velocidad de eliminación [d^{-1}]

t_c = tiempo al final de la fase de absorción;

estos programas informáticos calculan los valores de BAF_K, k_s y k_e.

Cuando la concentración de fondo en los gusanos no expuestos, por ejemplo en el día 0, se aparta significativamente de cero (como puede suceder, por ejemplo, con los metales), es necesario incluir la concentración de fondo ($C_{a,0}$) en estas ecuaciones, que así se convierten en las siguientes:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 3]}$$

y

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuación 4]}$$

En los casos en que se observe un descenso significativo de la concentración de la sustancia problema en el suelo a lo largo del tiempo durante la fase de absorción, pueden utilizarse los modelos siguientes, por ejemplo (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[ecuación 5]}$$

▼M4

donde:

C_s = concentración de sustancia en el suelo [g kg^{-1} de peso húmedo o seco]

k_0 = constante de la velocidad de degradación en el suelo [d^{-1}]

C_0 = concentración inicial de sustancia en el suelo [g kg^{-1} de peso húmedo o seco]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuación 7]}$$

donde:

C_a = concentración de sustancia en los gusanos [g kg^{-1} de peso húmedo o seco]

k_s = constante de la velocidad de absorción en los tejidos [g de suelo kg^{-1} de gusanos d^{-1}]

k_0 = constante de la velocidad de degradación en el suelo [d^{-1}]

k_e = constante de la velocidad de eliminación [d^{-1}]

t_c = tiempo al final de la fase de absorción.

Cuando se alcanza el estado de equilibrio durante la fase de absorción (es decir, t = ∞), la ecuación 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 1]}$$

puede reducirse a:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

o

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[ecuación 8]}$$

Entonces, k_s/k_e x C_s es una aproximación de la concentración de la sustancia problema en el tejido de los gusanos en el estado de equilibrio ($C_{a,ss}$).

El factor de acumulación biota-suelo (BSAF) puede calcularse de la forma siguiente:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ecuación 9]}$$

donde f_{oc} es la fracción de carbono orgánico del suelo, y f_{lip} es la fracción de lípidos de los gusanos, habiéndose determinado ambos valores preferentemente en muestras tomadas del ensayo, y referidos al peso seco o al peso húmedo.

La cinética de eliminación puede modelizarse utilizando los datos de la fase de eliminación y aplicando la siguiente ecuación modelo y un método informático de estimación de parámetros no lineales. Si la representación de los datos frente al tiempo indica un declive exponencial constante de la concentración de la sustancia problema en los animales, puede utilizarse un modelo monocompartimental (ecuación 9) para describir la evolución temporal de la eliminación.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ecuación 10]}$$

▼**M4**

Los procesos de eliminación a veces resultan bifásicos, con un rápido declive de C_a durante las primeras etapas, que luego se convierte en una pérdida más lenta de sustancia problema en las fases posteriores de la eliminación [véanse, por ejemplo, (27) (68)]. Las dos fases pueden interpretarse aceptando que hay dos compartimentos diferentes en el organismo, y la sustancia problema sale de cada uno de ellos a diferentes velocidades. En estos casos hay que consultar la bibliografía específica, como (38) (39) (40) (78).

Utilizando las ecuaciones modelo anteriores, es posible calcular también los parámetros cinéticos (k_s y k_e) de una sola vez aplicando el modelo de cinética de primer orden a todos los datos de las fases tanto de absorción como de eliminación, simultáneamente. Para encontrar una descripción de un método que permita este cálculo combinado de las constantes de velocidad de absorción y de eliminación, pueden consultarse las referencias (41) (73) y (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[ecuación 11]}$$

Nota: Cuando los parámetros de absorción y de eliminación se estiman simultáneamente a partir de los datos combinados de absorción y de eliminación, el símbolo "m" de la ecuación 11 es un descriptor que permite al programa informático asignar los subtérminos de la ecuación a los conjuntos de datos de la fase respectiva y llevar a cabo la evaluación correctamente (m = 1 para la fase de absorción; m = 2 para la fase de eliminación).

No obstante, estas ecuaciones modelo deben emplearse con precaución, especialmente cuando durante el ensayo se producen cambios en la (bio)degradación o en la biodisponibilidad de la sustancia problema [véase, por ejemplo, (79)].

▼M4

Apéndice 3

EJEMPLOS DE CALENDARIOS DE ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN EN EL SUELO

Ensayo con gusanos de tierra

a) Fase de absorción con ocho fechas de muestreo para el cálculo de la cinética

Día	Actividad
– 6	Acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado.
– 4	Adición de la solución de la sustancia problema a la fracción del suelo; evaporación de los eventuales disolventes; mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; equilibrado a las condiciones de ensayo durante 4 días (3 semanas en caso de adición de metales al suelo).
– 3 a – 1	Separación de los organismos de ensayo del cultivo de aclimatación; preparación y humidificación de los componentes del suelo.
0	Medición de la temperatura y del pH del suelo; toma de muestras del suelo de los recipientes de tratamiento y de los controles de disolvente para determinar la concentración de la sustancia problema; adición de la ración alimentaria; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; conservación de suficientes submuestras de gusanos para la determinación de los valores analíticos de fondo, peso húmedo y seco, y contenido lipídico; pesada de todos los recipientes de ensayo para controlar la humedad del suelo; control del aporte de aire, si se utiliza un sistema de ensayo cerrado.
1	Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema.
2	Como el día 1.
3	Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura.
4	Como el día 1.
5-6	Como el día 3.
7	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
8-9	Como el día 3.
10	Como el día 1.
11-13	Como el día 3.
14	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
15-16	Como el día 3.
17	Como el día 1.
18-20	Como el día 3.

▼**M4**

Día	Actividad
21	Como el día 1; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; final de la fase de absorción; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio, para la fase de eliminación (sin purga intestinal); toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes.
	Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema.
	Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables).

b) Fase de eliminación

Día	Actividad
– 6	Preparación y humidificación de los componentes del suelo; acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado.
– 4	Mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; incubación a las condiciones de ensayo durante 4 días.
0 (final de la fase de absorción)	Medición de la temperatura y del pH del suelo; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; adición de la ración alimentaria; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio; toma de muestras de suelo y de gusanos al cabo de 4 – 6 horas para determinar la concentración de la sustancia problema.
1	Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema.
2	Como el día 1.
3	Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura.
4	Como el día 1.
5-6	Como el día 3.
7	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
8-9	Como el día 3.
10	Como el día 1.
11-13	Como el día 3.
14	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
15-16	Como el día 3.
17	Como el día 1.

▼M4

Día	Actividad
18-20	Como el día 3.
21	Como el día 1; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes.
	La preparación del suelo antes del inicio de la fase de eliminación debe hacerse de la misma forma que antes de la fase de absorción.
	Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables).

Ensayo con enquitreidos

a) Fase de absorción con ocho fechas de muestreo para el cálculo de la cinética

Día	Actividad
– 6	Acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado.
– 4	Adición de la solución de la sustancia problema a la fracción del suelo; evaporación de los eventuales disolventes; mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; equilibrado a las condiciones de ensayo durante 4 días (3 semanas en caso de adición de metales al suelo).
-3 a -1	Separación de los organismos de ensayo del cultivo de aclimatación; preparación y humidificación de los componentes del suelo.
0	Medición de la temperatura y del pH del suelo; toma de muestras del suelo de los recipientes de tratamiento y de los controles de disolvente para determinar la concentración de la sustancia problema; adición de la ración alimentaria al suelo; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; conservación de suficientes submuestras de gusanos para la determinación de los valores analíticos de fondo, peso húmedo y seco, y contenido lipídico; pesada de todos los recipientes de ensayo para controlar la humedad del suelo; control del aporte de aire, si se utiliza un sistema de ensayo cerrado.
1	Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema.
2	Como el día 1.
3	Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura.
4	Como el día 1.
5-6	Como el día 3.
7	Como el día 1; adición de la ración alimentaria al suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
9	Como el día 1.
10	Como el día 3.

▼**M4**

Día	Actividad
11	Como el día 1.
12-13	Como el día 3.
14	Como el día 1; adición de la ración alimentaria al suelo; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; final de la fase de absorción; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio, para la fase de eliminación (sin purga intestinal); toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes.
	Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema.
	Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables).

▼M4

Apéndice 4

Suelo artificial — recomendaciones de preparación y conservación

Dado que es posible que no se disponga durante todo el año de suelos naturales de una fuente particular, y que la presencia de organismos endógenos y de microcontaminantes puede influir en el ensayo, se recomienda emplear en este ensayo el suelo artificial indicado en el capítulo C.8 del presente anexo, Toxicidad para gusanos de tierra (48). Son varias las especies de ensayo que pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en este suelo, y se facilita con él una normalización máxima, así como la comparabilidad intra e interlaboratorios de las condiciones de ensayo y de cultivo.

Componentes del suelo:

Turba:	10 %	Turba esfágnea, de acuerdo con las directrices 207 de la OCDE (48),
Arena de cuarzo:	70 %	Arena de cuarzo industrial (secada al aire); granulometría: más del 50 % de las partículas debe estar en la banda de 50-200 µm, pero todas las partículas deben tener ≤ 2 mm,
Caolín:	20 %	Contenido en caolinita ≥ 30 %,
Carbonato de calcio:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro.

Como opción, puede reducirse el contenido de carbono orgánico del suelo artificial como, por ejemplo, rebajando el contenido de turba al 4-5 % de suelo seco y aumentando análogamente el contenido de arena. Con esta reducción del contenido de carbono orgánico, es posible que disminuyan las posibilidades de adsorción de la sustancia problema al suelo (carbono orgánico) y que aumente la disponibilidad de la sustancia problema para los gusanos (74). Se ha demostrado que *Enchytraeus albidus* y *Eisenia fetida* pueden ajustarse a los criterios de validez sobre la reproducción cuando se someten a ensayo en suelos de campo con un contenido menor de carbono orgánico como, por ejemplo, del 2,7 % (33) (61), y la experiencia demuestra que esto también puede conseguirse en suelo artificial con un 5 % de turba.

Preparación

Los componentes secos del suelo se mezclan a fondo (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala). Esta operación debe efectuarse alrededor de una semana antes de que se inicie el ensayo. La mezcla de componentes secos del suelo debe humedecerse con agua desionizada, al menos 48 h antes de que se añada la sustancia problema a fin de equilibrar o estabilizar la acidez. Para la determinación del pH se utiliza una mezcla de suelo y solución 1 M de KCl en la proporción de 1:5. Si el pH no se encuentra en la banda necesaria (6,0 ± 0,5), se añade al suelo una cantidad suficiente de $CaCO_3$ o se prepara un nuevo lote de suelo.

Se determina de acuerdo con la norma ISO 11268-2 (35) la capacidad de retención de agua (WHC) máxima del suelo artificial. Al menos dos días antes del inicio del ensayo, el suelo artificial seco se humedece añadiéndole una cantidad suficiente de agua desionizada o reconstituida para obtener aproximadamente la mitad del contenido final de agua. El contenido final de agua debe estar entre el 40 y el 60 % del WHC máximo. Al inicio del ensayo, el suelo previamente humedecido se divide en tantos lotes como concentraciones de ensayo y controles se vayan a emplear en el ensayo, y el contenido de humedad se ajusta al 40 – 60 % del WHC_{max} utilizando la solución de la sustancia problema o añadiendo agua desionizada o reconstituida. Se determina el contenido de humedad al inicio y al final del ensayo (a 105 °C). El resultado debe ser óptimo para los requisitos de la especie utilizada (también es posible comprobar el contenido de humedad de la manera siguiente: cuando el suelo se aprieta suavemente con la mano, deben aparecer gotitas de agua entre los dedos).

▼M4

Almacenamiento

Los componentes secos del suelo artificial pueden conservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. El suelo preparado, humedecido previamente, puede conservarse en un lugar fresco hasta tres días antes de que se le añada la sustancia problema; debe velarse por reducir al mínimo la evaporación de agua. Una vez se le haya añadido la sustancia problema, el suelo debe utilizarse inmediatamente, salvo que se disponga de información en el sentido de que ese suelo concreto puede conservarse sin que se vea afectada la toxicidad ni la biodisponibilidad de la sustancia problema. En tal caso, es posible conservar, en las condiciones recomendadas para el ensayo concreto, las muestras de suelo con la sustancia problema añadida hasta el momento de su análisis.

▼M4

Apéndice 5

Especies de oligoquetos recomendadas para el ensayo de bioacumulación a partir del suelo

Gusanos de tierra

La especie recomendada para el ensayo es *Eisenia fetida* (Savigny 1826), que pertenece a la familia Lumbricidae. Desde 1972 está dividida en dos subespecies [*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* (10)]. Según Jaenike (36), se trata de verdaderas especies aparte. *Eisenia fetida* se reconoce fácilmente por sus rayas intersegmentales de color amarillo claro, mientras que *Eisenia andrei* tiene color rojo oscuro uniforme. Proceden probablemente de la region del mar Negro, y actualmente tienen una distribución universal, especialmente en hábitats modificados antropogénicamente, como las pilas de compost. Las dos especies pueden utilizarse en ensayos tanto ecotoxicológicos como de bioacumulación.

Eisenia fetida y *Eisenia andrei* están disponibles en el comercio, por ejemplo como cebos de pesca. En comparación con otros gusanos de tierra lumbrícidos, tienen un ciclo de vida breve y alcanzan la madurez en el plazo de unos 2 o 3 meses (a temperatura ambiente). Su temperatura óptima es de unos 20 – 24 °C; prefieren sustratos relativamente húmedos, con un pH casi neutro y un elevado contenido de materia orgánica. Como estas especies llevan unos 25 años utilizándose ampliamente en ensayos ecotoxicológicos normalizados, su cultivo se conoce muy bien (48) (77).

Ambas especies pueden cultivarse en una amplia gama de residuos animales. El medio de cría recomendado por la ISO (35) es una mezcla al 50 % de estiércol de caballo o de vaca y de turba. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato de calcio) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mS/cm o menos del 0,5 % de concentración salina), y no debe presentar una contaminación excesiva de amoníaco ni de orina animal. También puede utilizarse un suelo comercial de jardinería exento de aditivos, o un suelo artificial de acuerdo con la OCDE (48), o una mezcla de ambos al 50 %. El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Son adecuados los incubadores de un volumen entre 10 y 50 litros.

Para obtener gusanos de edad y masa normalizadas, lo mejor es iniciar el cultivo con capullos. Por tanto, se añaden gusanos adultos a un incubador que contenga sustrato fresco para producir capullos. La experiencia práctica indica que se obtienen buenas tasas de reproducción con una densidad de población de unos 100 gusanos adultos por kg de sustrato (peso húmedo). Tras 28 días se extraen los gusanos adultos. Los gusanos de tierra que salen de los capullos se utilizan para los ensayos una vez hayan madurado, al cabo de un mínimo de 2 meses y un máximo de 12 meses.

Los gusanos de las especies antes descritas pueden considerarse sanos si se mueven a través del sustrato, no intentan abandonarlo y se reproducen continuamente. Un movimiento muy lento o un color amarillo en el extremo posterior (en el caso de *Eisenia fetida*) son indicativos de agotamiento del sustrato. En este caso, se recomienda añadir sustrato fresco o rebajar el número de animales por incubador.

Bibliografía adicional seleccionada

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology-from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enquitreidos

La especie recomendada es *Enchytraeus albidus,* Henle 1837 (gusano blanco). Esta especie es una de las más grandes (hasta 15 mm) de la familia Enchytraeidae de los anélidos oligoquetos y presenta una distribución universal [véase, por ejemplo, (8)]. *Enchytraeus albidus* se encuentra en hábitats marinos, lacustres y terrestres, sobre todo en materia orgánica en descomposición (algas, compost) y raramente en praderas (42). Esta amplia tolerancia ecológica y algunas variaciones morfológicas indican que la especie podría tener diferentes razas.

Enchytraeus albidus se encuentra en el comercio, vendida como alimento para peces. Ha de comprobarse si el cultivo está contaminado con otras especies, generalmente más pequeñas (60). Si se da la contaminación, hay que lavar todos los gusanos con agua en una placa Petri. Después se seleccionan ejemplares adultos grandes de *Enchytraeus albidus* (empleando un microscopio estereoscópico) para iniciar un nuevo cultivo. Se desechan todos los demás gusanos. Tienen un breve ciclo de vida, ya que alcanzan la madurez entre los 33 días (a 18 °C) y los 74 días (a 12 °C). Solo deben utilizarse para los ensayos los cultivos que hayan estado en el laboratorio al menos 5 semanas (una generación) sin problemas.

También son adecuadas otras especies del género *Enchytraeus,* en particular *Enchytraeus luxuriosus.* Esta especie es un verdadero habitante del suelo, que se ha descrito recientemente en (65). Si se utilizan otras especies de *Enchytraeus,* deben identificarse claramente y hay que indicar los motivos por los que se han seleccionado.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) es una especie que pertenece al mismo grupo que *Enchytraeus luxuriosus.* No se ha determinado con certeza si existe en el campo, ya que solo se ha descrito a partir de cultivos de gusanos de tierra y de pilas de compost (Römbke 2003). Por tanto, no se conocen sus requisitos ecológicos originales. Sin embargo, en estudios de laboratorio recientes en varios suelos de campo se ha confirmado que esta especie muestra una amplia tolerancia respecto a propiedades del suelo como el pH y la textura (Jänsch *et al.* 2005). En los últimos años se está utilizando esta especie con frecuencia en estudios ecotoxicológicos debido a la simplicidad de su cultivo y de sus ensayos, por ejemplo según Kuperman *et al.* 2003). Sin embargo, es pequeña (3 – 12 mm; 7 mm de media (Westheide & Müller 1996), lo que hace que sea más difícil de manejar que *Enchytraeus albidus.* Cuando se utiliza esta especie en lugar de *Enchytraeus albidus,* es posible reducir el tamaño del recipiente de ensayo, aunque no es necesario. Por otra parte, ha de tenerse en cuenta que esta especie se reproduce muy rápidamente, con un tiempo de generación inferior a 20 días a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) e incluso más deprisa a temperaturas más altas.

Los enquitreidos de la especie *Enchytraeus albidus* (así como otras especies del género *Enchytraeus*) pueden criarse en grandes cajas de plástico (por ejemplo, de 30 × 60 × 10 cm o 20 × 12 × 8 cm, que es adecuado para el cultivo de gusanos de pequeño tamaño) llenas de una mezcla de suelo artificial y de suelo de jardín comercial, sin contaminar y exento de aditivos. Debe evitarse material de compost, ya que podría contener sustancias tóxicas, como metales pesados. Antes de utilizar el suelo de cultivo hay que eliminar la fauna, congelándolo tres veces. También puede utilizarse suelo artificial puro, pero la tasa de reproducción podría ser menor que la obtenida con sustratos mixtos. El sustrato debe tener un pH de 6,0 ± 0,5. El cultivo se mantiene en un incubador a la temperatura de 15 ± 2 °C a oscuras. En cualquier caso, ha de evitarse una temperatura superior a 23 °C. El suelo artificial/natural debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Cuando se aprieta el suelo suavemente con la mano, solo deben aparecer gotitas de agua. En todo caso hay que evitar las condiciones anóxicas (es decir, si se utiliza tapa, el número de agujeros de esta debe bastar para que sea suficiente la renovación del aire). El suelo del cultivo debe airearse removiéndolo cuidadosamente una vez por semana.

▼M4

Debe darse alimento a los gusanos *ad libitum* al menos una vez por semana con granos aplastados de avena que se introducen en una cavidad de la superficie del suelo y se recubren con suelo. Si queda comida en el recipiente desde la última vez que se les haya dado, será necesario ajustar en consecuencia la cantidad de alimento dado. Si se aprecia crecimiento fúngico en la comida restante, será necesario sustituir esta por una nueva cantidad de granos aplastados de avena. Para estimular la reproducción, es posible complementar cada dos semanas los granos aplastados de avena utilizando proteínas en polvo con vitaminas añadidas, disponibles en el comercio. Al cabo de tres meses, los animales se transfieren a un sustrato de cría o cultivo recién preparado. Los granos aplastados de avena, que deben conservarse en recipientes herméticamente cerrados, tienen que pasarse por el autoclave o calentarse antes de su utilización para evitar infecciones por ácaros de la harina (por ejemplo, *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) o ácaros depredadores [por ejemplo, *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles,* Gamasida, Acarina]. Tras su desinfección, el alimento se muele de forma que sea fácil de espolvorear sobre la superficie del suelo. Otra posible fuente de alimento es la levadura de panadería o la comida para peces TetraMin®.

En general, las condiciones de cultivo son suficientes si los gusanos no intentan abandonar el sustrato, se mueven rápidamente por el suelo, presentan una superficie externa brillante sin que se les adhieran partículas del suelo, presentan un color más o menos blanquecino, y se observan gusanos de diferentes edades. En realidad, puede considerarse que los gusanos están sanos si se reproducen continuamente.

Bibliografía adicional seleccionada

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.