32001L0059

DIRECTIVA 2001/59/CE A COMISIEI
din 6 august 2001
de efectuare a celei de-a douăzeci și opta adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 67/548/CEE a Consiliului din 27 iunie 1967 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase [1], astfel cum a fost modificată ultima dată prin Directiva 2000/33/CE a Comisiei [2], în special articolul 28,

întrucât:

(1) Anexa I la Directiva 67/548/CEE conține o listă a substanțelor periculoase, împreună cu detaliile clasificării și etichetării fiecărei substanțe. Cunoștințele științifice și tehnice actuale au arătat că lista substanțelor periculoase din anexa menționată ar trebui adaptată la progresul tehnic. În special, nomenclatura finlandeză și suedeză trebuie incluse în tabelele A și B din cuvântul introductiv la anexa I. Unele versiuni lingvistice ale directivei necesită corecții tehnice în anumite secțiuni din cuvântul introductiv la anexa I. Este util să se publice o versiune actualizată și refăcută a cuvântului introductiv la anexa I. În plus, este necesar ca lista însăși să fie actualizată pentru a include noi substanțe notificate și alte substanțe existente; este necesar ca identitatea, nomenclatura, clasificarea, etichetarea și limitele de concentrație ale anumitor substanțe să fie modificate astfel încât să reflecte noile cunoștințe tehnice; este necesar ca trei intrări de pe listă să fie eliminate deoarece substanțele în cauză sunt reglementate la alte intrări.

(2) Anexa II la Directiva 67/548/CEE conține o listă de simboluri și indicații de pericol pentru substanțele și preparatele periculoase. Anexa III la Directiva 67/548/CEE conține o listă a frazelor ce indică natura riscurilor specifice atribuite substanțelor și preparatelor periculoase. Anexa IV la Directiva 67/548/CEE conține o listă a frazelor de prudență privind substanțele și preparatele periculoase. Formulările în limbile finlandeză și suedeză trebuie incluse în anexele II, III și IV. Anumite versiuni lingvistice ale directivei necesită corecții în anumite secțiuni din anexele II, III și IV. Este util să se publice versiunile actualizate și refăcute ale anexelor II, III și IV.

(3) Articolul 1 din Directiva 1993/33/CE a Parlamentului European și a Consiliului [3] a permis Suediei între 1 ianuarie 1999 și 31 decembrie 2000 să ceară utilizarea frazei de risc suplimentare R340, care nu figurează în anexa III, pentru substanțe clasificate drept cancerigene de categoria 3, în locul frazei de risc R40. Experții din statele membre au convenit să revizuiască textul frazei de risc R40 pentru a face referire la substanțele cancerigene de categoria 3. Este necesar să se adauge o nouă frază de risc R68 în anexa III care să conțină textul original al frazei de risc R40 pentru clasificarea și etichetarea substanțelor nocive și mutagene de categoria 3 enumerate în anexa I. Prin urmare, este necesar să se revizuiască clasificarea, etichetarea și referirile la limita de concentrație din anexa I care includ R40 pentru astfel de substanțe nocive și mutagene de categoria 3.

(4) Anexa V la Directiva 67/548/CEE stabilește metodele de determinare a proprietăților fizico-chimice, a toxicității și ecotoxicității substanțelor și preparatelor. Această anexă trebuie adaptată la progresul tehnic. Este oportun să se reducă la minim numărul animalelor folosite în scopuri experimentale, în conformitate cu Directiva 86/609/CEE a Consiliului [4]. Prin urmare, este necesar să se elimine capitolul B.1, deoarece sunt disponibile metode alternative, care folosesc mai puține animale. Este necesar să se acorde atenția cuvenită metodelor recunoscute și recomandate de organizațiile internaționale competente. Este necesar ca metodele pentru toxicitatea orală subcronică din capitolele B.26 și B.27 să fie revizuite în consecință, iar capitolele C.14-C.20 referitoare la toxicitatea față de mediu să fie

[1] JO 196, 16.8.1967, p. 1.
[2] JO L 136, 8.6.2000, p. 90.
[3] JO L 199, 30.7.1999, p. 57.
[4] JO L 358, 18.12.1986, p. 1.

adăugate la anexa V. Anumite versiuni lingvistice necesită corecții tehnice în anumite secțiuni din anexa V.

(5) Anexa VI la Directiva 67/548/CEE conține un ghid pentru clasificarea și etichetarea substanțelor și preparatelor periculoase. Această anexă trebuie adaptată la progresul tehnic. Anumite versiuni lingvistice ale directivei necesită corecții tehnice în anumite secțiuni din anexa VI. Anumite secțiuni trebuie să fie publicate în finlandeză și suedeză. Este util să se publice o versiune actualizată și refăcută a anexei VI, în special incluzând trimiterea la Directiva 1999/45/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 31 mai 1999 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative ale statelor membre referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea preparatelor periculoase ([1]).

(6) În conformitate cu dispozițiile Directivei 67/548/CEE, orice substanță nouă introdusă pe piață trebuie notificată autorităților competente din statele membre prin intermediul unei notificări care să conțină anumite informații, inclusiv un dosar tehnic. Pentru substanțele noi generate și apoi consumate într-o reacție chimică, aflate sub control strict (produse intermediare cu expunere limitată), este justificat și adecvat din punct de vedere tehnic să fie definit un pachet de teste redus (PTR). Progresul tehnic actual poate garanta o expunere minimă a omului și a mediului prin limitarea riguroasă a procesului.

(7) Este necesar ca dosarul tehnic să conțină un pachet de teste pentru produsele intermediare cu expunere limitată care să furnizeze informațiile necesare pentru evaluarea riscului previzibil pe care îl prezintă pentru om și mediu. Anexa VII trebuie să precizeze conținutul acestui dosar tehnic și anexa VIII trebuie să prezinte în detaliu testele și studiile suplimentare care pot fi cerute pentru produsele intermediare comercializate în cantități mai mari.

(8) Ar putea fi necesară revizuirea criteriilor de notificare a produselor intermediare cu expunere limitată pentru a ține cont de progresul tehnic și de experiența acumulată cu prilejul notificărilor făcute în conformitate cu noile cerințe specifice din prezenta directivă.

(9) Măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului pentru adaptarea la progresul tehnic a directivelor privind eliminarea barierelor tehnice din calea comerțului cu substanțe și preparate periculoase,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Directiva 67/548/CEE se modifică după cum urmează:

1. Anexa I se modifică după cum urmează:

   (a) Tabelele A și B din cuvântul introductiv la anexa I includ nomenclatura finlandeză și suedeză. Anumite versiuni lingvistice ale directivei includ corecții tehnice în anumite secțiuni din cuvântul introductiv și din tabelele A și B. Cuvântul introductiv care cuprinde tabelele A și B se înlocuiește cu anexa 1A la prezenta directivă.

   (b) Intrările corespunzătoare se înlocuiesc cu intrările din anexa 1B la prezenta directivă.

   (c) Se introduc intrările din anexa 1C la prezenta directivă.

   (d) Se elimină intrările din anexa 1D la prezenta directivă.

   (e) Intrările prezentate în anexa 1E la prezenta directivă se modifică prin înlocuirea referințelor de clasificare ca „mutagen de categoria 3; R40” cu „mutagen de categoria 3; R68” și prin înlocuirea referințelor de etichetare R40 cu R68.

   (f) Intrările prezentate în anexa 1F la prezenta directivă se modifică prin înlocuirea referințelor de clasificare ca „Xn; R40” cu „Xn; R68” și prin înlocuirea referințelor de etichetare R40 cu R68.

   (g) Intrarea prezentată în anexa 1G la prezenta directivă se modifică prin înlocuirea referințelor la concentrațiile-limită ca „Xn; R40/20/21/22” cu „Xn; R68/20/21/22”.

   (h) Intrarea prezentată în anexa 1H la prezenta directivă se modifică prin înlocuirea referințelor la concentrațiile-limită ca „Xn; R20/21/22-40/20/21/22” cu „Xn; R20/21/22-68/20/21/22”.

   (i) Intrările prezentate în anexa 1I la prezenta directivă se modifică prin înlocuirea referințelor de clasificare ca „mutagen de categoria 3; R40” cu „mutagen de categoria 3; R68”.

   (j) Intrările prezentate în anexa 1J la prezenta directivă se modifică prin înlocuirea referințelor de clasificare ca „mutagen de categoria 3; R40” cu „mutagen de categoria 3; R68” și prin adăugarea R68 pe etichetă.

2. Anexa II include versiunile suedeză și finlandeză, precum și corecțiile tehnice în anumite versiuni lingvistice. Prin urmare, anexa II se înlocuiește cu anexa 2 la prezenta directivă.

3. Anexa III include versiunile suedeză și finlandeză, precum și corecțiile tehnice în anumite versiuni lingvistice. Prin urmare, anexa III se înlocuiește cu anexa 3 la prezenta directivă.

4. Anexa IV include versiunile suedeză și finlandeză, precum și corecțiile tehnice în anumite versiuni lingvistice. Prin urmare, anexa IV se înlocuiește cu anexa 4 la prezenta directivă.

([1]) JO L 200, 30.7.1999, p. 1.

5. Anexa V se modifică după cum urmează:

(a) Capitolul B.1 se elimină.

(b) Titlul versiunii în limba engleză a capitolului B13/14 se înlocuiește cu textul din anexa 5A.

(c) Ultima teză din versiunea franceză a alineatului 1.4.2.2 din capitolul B.39 se înlocuiește cu textul din anexa 5B.

(d) Ecuația din ultima teză de la punctul 1.7.1.6 din versiunea engleză a capitolului B.41 se înlocuiește cu textul din anexa 5C.

(e) Metoda de testare pentru testele de toxicitate orală subcronică la rozătoare se modifică în conformitate cu anexa 5D la prezenta directivă, care înlocuiește capitolul B.26.

(f) Metoda de testare pentru testele de toxicitate orală subcronică la alte specii decât cele din ordinul rozătoarelor se modifică în conformitate cu anexa 5E la prezenta directivă, care înlocuiește capitolul B.27.

(g) Cele șapte noi metode de testare a toxicității pentru mediu din anexa 5F la prezenta directivă se includ în partea C.

6. Anexa VI include versiunile suedeză și finlandeză, corecțiile tehnice în anumite versiuni lingvistice și alte actualizări tehnice detaliate. Prin urmare, anexa VI se înlocuiește cu anexa 6 la prezenta directivă.

7. Anexa VII.A include un dosar tehnic conținând un pachet de teste pentru produsele intermediare cu expunere limitată, care să furnizeze informațiile necesare pentru evaluarea riscului previzibil pe care îl prezintă pentru om și mediu. Anexa VII.A se modifică, în consecință, după cum urmează:

(a) textul din anexa 7A la prezenta directivă se introduce înainte de secțiunea 0 din anexa VII.A;

(b) textul din anexa 7B la prezenta directivă se introduce la sfârșitul anexei VII.A.

8. Anexa VIII include testele și studiile suplimentare necesare pentru produsele intermediare cu expunere limitată comercializate în cantități mai mari. Prin urmare, anexa VIII se modifică după cum urmează:

(a) textul din anexa 8A la prezenta directivă se introduce între „Nivelul 1” și „Studiile fizico-chimice” din anexa VIII;

(b) textul din anexa 8B la prezenta directivă se introduce între „Nivelul 2” și „Studiile toxicologice” din anexa VIII.

Articolul 2

(1) Statele membre adoptă și publică actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 30 iulie 2002. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

(2) Statele membre aplică actele cu putere de lege și actele administrative menționate la alineatul (1):

(a) de la 30 iulie 2002 sau înainte de această dată pentru substanțele periculoase;

(b) de la 30 iulie 2002 pentru preparate care nu intră sub incidența Directivei 91/414/CEE a Consiliului [1] sau a Directivei 98/8/CE a Parlamentului European și a Consiliului [2];

(c) de la 30 iulie 2004 pentru preparatele care intră sub incidența Directivei 91/414/CEE sau a Directivei 98/8/CE.

Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă aceste dispoziții, ele cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

(3) Statele membre comunică Comisiei textul principalelor dispoziții de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă, precum și un tabel de corespondență între prezenta directivă și dispozițiile naționale adoptate.

Articolul 3

Prezenta directivă intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 6 august 2001.

Pentru Comisie

Margot WALLSTRÖM

Membru al Comisiei

[1] JO L 230, 19.8.1991, p. 1.
[2] JO L 123, 24.4.1998, p. 1.

ANEXA 1A

CUVÂNT INTRODUCTIV LA ANEXA I

Introducere

Anexa I este un repertoar al substanțelor periculoase pentru care s-au convenit la nivel comunitar o clasificare și o etichetare armonizate, în conformitate cu procedura prevăzută la articolul 4 alineatul (3) din prezenta directivă.

Numerotarea intrărilor

Intrările din anexa I se ordonează după numărul atomic al elementului celui mai caracteristic al proprietăților lor. O listă cu elementele chimice stabilită în funcție de numărul atomic figurează în tabelul A. Datorită varietății lor, substanțele organice au făcut obiectul unei clasificări convenționale, care se găsește în tabelul B.

Numărul de index al fiecărei substanțe se prezintă sub forma unei serii de cifre de tipul: ABC-RST-VW-Y, în care:

— ABC reprezintă fie numărul atomic al elementului chimic cel mai caracteristic (precedat de unul sau de două zerouri pentru completare), fie numărul convențional de clasificare a substanțelor organice,

— RST reprezintă numărul de ordine al substanțelor în cadrul seriilor ABC,

— VW reprezintă forma sub care substanța este produsă sau comercializată,

— Y reprezintă cifra de control (check digit), stabilită în conformitate cu metoda ISBN (International Standard Book Number).

De exemplu, numărul de index al cloratului de sodiu este 017-005-00-9.

Pentru substanțele periculoase cuprinse în Inventarul european al substanțelor chimice existente introduse pe piață (IESCE, JO C 146 A, 15.6.1990), intrarea cuprinde și numărul IESCE. Aceste numere se prezintă sub forma unei serii de șapte cifre de tipul XXX-XXX-X, începând cu 200-001-8.

Pentru substanțele periculoase notificate în conformitate cu prezenta directivă, intrarea cuprinde și numărul substanței înregistrate în Lista europeană a substanțelor chimice notificate (ELINCS). Aceste numere se prezintă sub forma unei serii de șapte cifre de tipul XXX-XXX-X, începând cu 400-010-9.

Pentru substanțele periculoase din lista de „ex-polimeri" (no-longer polymers – document al *Oficiului pentru Publicații Oficiale ale Comunităților Europene*, 1997, ISBN 92-827-8995-0) se include și numărul corespunzător din această listă. Acest număr se prezintă sub forma unei serii de șapte cifre de tipul XXX-XXX-X, începând cu 500-001-0.

Numărul CAS (Chemical Abstracts Service) este, de asemenea, menționat pentru a facilita identificarea intrării. Trebuie reținut că numărul IESCE cuprinde atât forma anhidră, cât și formele hidratate ale substanțelor, iar numerele CAS sunt adesea diferite pentru formele anhidre, respectiv hidratate. Numărul CAS indicat se referă doar la forma anhidră și, prin urmare, numărul CAS prezentat nu descrie întotdeauna intrarea cu aceeași precizie ca numărul IESCE.

În general, numerele IESCE, ELINCS, „ex-polimeri" sau CAS nu sunt incluse pentru intrările care cuprind mai mult de patru substanțe diferite.

Nomenclatura

Ori de câte ori este posibil, substanțele periculoase sunt desemnate prin denumirile utilizate în IESCE, ELINCS sau de „ex-polimeri". Celelalte substanțe neînregistrate în IESCE, ELINCS sau pe lista de „ex-polimeri" sunt desemnate printr-o denumire chimică recunoscută la nivel internațional (de exemplu, ISO, IUPAC). În unele cazuri, se adaugă o denumire uzuală.

De regulă, impuritățile, aditivii și componenții secundari nu sunt menționați decât dacă au un aport semnificativ la clasificarea substanțelor.

Anumite substanțe sunt descrise ca fiind un „amestec de A și B". Aceste intrări fac referire la un amestec specific. În unele cazuri, în care este necesară caracterizarea substanței comercializate, se indică proporțiile principalelor substanțe din amestec.

Anumite substanțe sunt descrise printr-un procentaj specific de puritate. Substanțele care prezintă un procentaj superior de materie activă (de exemplu, un peroxid organic) nu sunt menționate în anexa I și pot prezenta alte proprietăți periculoase (de exemplu, pot fi explozive). Dacă se indică limitele de concentrație specifice, acestea se aplică substanței sau substanțelor ce figurează la intrarea respectivă. În special, în cazul intrărilor ce corespund unor amestecuri de substanțe a căror descriere cuprinde indicarea unui procentaj de puritate specific, limitele se aplică substanței așa cum este descrisă în anexa I, nu substanței pure.

Articolul 23 alineatul (2) litera (a) prevede ca pentru substanțele prevăzute la anexa I, denumirea substanței care urmează să fie utilizată pe etichetă să fie una din denumirile menționate în anexă. Pentru anumite substanțe au fost adăugate informații suplimentare între paranteze drepte, pentru a ajuta la identificarea substanței. Aceste informații suplimentare nu trebuie să figureze pe etichetă.

Anumite intrări conțin o referire la impurități. Un exemplu este numărul de index 607-190-00-X: acril-amido-metoxiacetat de metil (conține ≥ 0,1 % acrilamidă). În aceste cazuri, referința din paranteză face parte din denumire și trebuie să figureze pe etichetă.

Anumite intrări se referă la grupe de substanțe. Un exemplu este numărul de index 006-007-00-5:
„sărurile acidului cianhidric, cu excepția cianurilor complexe, cum sunt ferocianurile, fericianurile și oxicianura de mercur” Pentru substanțele individuale reglementate la aceste intrări trebuie folosită denumirea IESCE sau o altă denumire recunoscută internațional.

Modul de prezentare a intrărilor

Pentru fiecare substanță din anexa I se furnizează următoarele informații:

(a) *Clasificarea*

(i) procesul de clasificare constă în încadrarea substanței într-una sau mai multe categorii de pericol [conform definiției din articolul 2 alineatul (2) din Directiva 92/32/CEE a Consiliului (JO L 154, 5. 6.1992, p.1.)], precum și atribuirea uneia sau mai multor fraze de risc corespunzătoare. Clasificarea are consecințe nu doar asupra etichetării, ci și asupra altor acte cu putere de lege și norme administrative cu privire la substanțele periculoase;

(ii) clasificarea în fiecare categorie de pericol se prezintă, de regulă, sub forma unei abrevieri reprezentând categoria de pericol împreună cu fraza sau frazele de risc adecvate. Cu toate acestea, în unele cazuri (de exemplu, substanțele clasificate ca inflamabile sau sensibilizante ori anumite substanțe clasificate ca periculoase pentru mediu) se utilizează numai fraza de risc;

(iii) abrevierile pentru fiecare din categoriile de pericol sunt descrise după cum urmează:

— exploziv: E

— oxidant: O

— extrem de inflamabil: F+

— foarte inflamabil: F

— inflamabil: R10

— foarte toxic: T+

— toxic: T

— nociv: Xn

— coroziv: C

— iritant: Xi

— sensibilizant: R42 și/sau R43

— cancerigen: Carc. Cat. [1]

— mutagen: Muta. Cat. [1]

— toxic pentru reproducere: Repr. Cat. [1]

— periculos pentru mediu: N și/sau R52, R53, R59;

(iv) se indică și fraze de risc suplimentare, care au fost atribuite pentru a descrie alte proprietăți (a se vedea punctele 2.2.6 și 3.2.8 din ghidul de etichetare), chiar dacă nu fac în mod oficial parte din clasificare.

[1] Se menționează categoria corespunzătoare de substanță cancerigenă, mutagenă sau toxică pentru reproducere (1, 2 sau 3).

(b) *Eticheta* include:

(i) litera atribuită substanței în conformitate cu anexa II [a se vedea articolul 23 alineatul (2) litera (c)]. Aceasta are rolul de abreviere pentru simbol și pentru indicația de pericol (dacă acestea sunt atribuite);

(ii) frazele de risc, exprimate printr-o serie de cifre precedate de litera R care indică natura riscurilor specifice, în conformitate cu anexa III [a se vedea articolul 23 alineatul (2) litera (d)]. Cifrele sunt despărțite:

— fie printr-o liniuță (-) pentru pentru a arăta că e vorba de enunțuri separate referitoare la riscuri specifice (R),

— fie printr-o bară oblică (/) pentru a arăta că e vorba de un enunț combinat, într-o singură frază, referitor la riscurile specifice, așa cum figurează ele în anexa III;

(iii) frazele de prudență, exprimate printr-o serie de cifre precedate de litera S, care indică recomandările de prudență, în conformitate cu anexa IV [a se vedea articolul 23 alineatul (2) litera (e)]. Cifrele sunt, de asemenea, despărțite fie printr-o liniuță, fie printr-o bară oblică; enunțurile recomandărilor de prudență figurează în anexa IV. Frazele de prudență indicate se aplică numai substanțelor; pentru preparate, frazele se selectează în conformitate cu regulile obișnuite.

Trebuie reținut că unele fraze S sunt obligatorii pentru anumite substanțe și preparate periculoase vândute publicului larg.

Frazele S1, S2 și S45 sunt obligatorii pentru toate substanțele și preparatele foarte toxice, toxice și corozive vândute publicului larg.

Frazele S2 și S46 sunt obligatorii pentru toate celelalte substanțe și preparate vândute publicului larg, cu excepția celor clasificate exclusiv ca periculoase pentru mediu.

Frazele de prudență S1 și S2 sunt menționate între paranteze în anexa I și nu pot fi omise de pe etichetă decât dacă substanța sau preparatul este comercializat exclusiv în scop industrial.

(c) *Limitele de concentrație* și clasificările asociate necesare pentru clasificarea preparatelor periculoase care conțin substanța în cauză în conformitate cu Directiva 1999/45/CE.

Dacă nu se indică altfel, limitele de concentrație reprezintă un procent din greutatea substanței, calculate în raport cu greutatea totală a preparatului.

Atunci când nu se indică limitele de concentrație, limitele de concentrație care se vor utiliza la aplicarea metodei convenționale de evaluare a pericolelor pentru sănătate sunt cele din anexa II, iar când se aplică metoda convențională de evaluare a pericolelor pentru mediu, limitele de concentrație care trebuie folosite sunt cele din anexa III la Directiva 1999/45/CE a Parlamentului European și a Consiliului (JO L 200, 30.7.1999, p. 1).

Note explicative generale

Grupe de substanțe

Anexa I cuprinde un anumit număr de intrări referitoare la grupe de substanțe. În aceste cazuri, cerințele de clasificare și de etichetare se aplică tuturor substanțelor din grupă atunci când acestea sunt introduse pe piață, în măsura în care figurează în IESCE sau ELINCS. Atunci când o substanță care face obiectul unei intrări în grupă apare ca impuritate într-o altă substanță, pentru etichetarea substanțelor se iau în considerare cerințele de clasificare și etichetare descrise la intrarea în grupă.

Este posibil ca anumite substanțe la care se referă o intrare în grupă să facă obiectul unor cerințe specifice de clasificare și de etichetare. În acest caz, substanțele în cauză vor fi descrise într-o intrare distinctă în anexa I, iar intrarea în grupă va fi completată cu adnotarea „cu excepția substanțelor special menționate în această anexă".

În unele cazuri, unele substanțe individuale pot face obiectul mai multor intrări în grupă. De exemplu, oxalatul de plumb (nr. IESCE 212-413-5) face obiectul intrării pentru compușii plumbului (nr. de index 082-001-00-6), precum și a intrării pentru sărurile acidului oxalic (607-007-00-3). În aceste cazuri, etichetarea substanței reflectă etichetarea pentru fiecare din cele două intrări în grupă. În cazurile în care pentru același pericol se dau clasificări diferite, pentru etichetarea acelei substanțe se folosește clasificarea care face trimitere la pericolul cel mai grav (a se vedea explicația la nota A de mai jos).

Intrările din anexa I pentru săruri (indiferent de denumire) acoperă atât forma anhidră, cât și formele hidratate, cu excepția cazului în care există indicații contrare.

Substanțe cu număr ELINCS

În anexa I, substanțele având un număr ELINCS au fost notificate în conformitate cu dispozițiile prezentei directive. Producătorul sau importatorul care nu a notificat în prealabil aceste substanțe trebuie să facă trimitere la dispozițiile prezentei directive dacă intenționează să introducă pe piață substanțele respective.

Explicarea notelor referitoare la identificarea, clasificarea și etichetarea substanțelor

Nota A:

Denumirea substanței trebuie să figureze pe etichetă sub una din denumirile din anexa I [a se vedea articolul 23 alineatul (2) litera (a)].

În anexa I se folosește uneori o descriere generală de tipul „compuși de/ai …" sau „săruri de/ale …". În acest caz, producătorul sau orice altă persoană care introduce o astfel de substanță pe piață este obligat să precizeze pe etichetă denumirea chimică exactă, luând în considerare în mod corespunzător capitolul intitulat „Nomenclatura" din cuvântul introductiv.

Exemplu: pentru $BeCl_2$ (nr. IESCE 232-116-4): clorură de beriliu.

Directiva prevede, de asemenea, ca simbolurile, indicațiile de pericol, frazele R și frazele S ce urmează a fi folosite pentru fiecare substanță să fie cele menționate la anexa I [articolul 23 alineatul (2) literele (c), (d) și (e)].

Pentru substanțele care aparțin unui anumit grup de substanțe inclus în anexa I, simbolurile, indicațiile de pericol, frazele R și frazele S ce urmează a fi folosite pentru fiecare substanță sunt cele menționate la intrarea corespunzătoare din anexa I.

Pentru substanțele care aparțin mai multor grupe de substanțe incluse în anexa I, simbolurile, indicațiile de pericol, frazele R și frazele S ce urmează a fi folosite pentru fiecare substanță sunt cele care figurează la ambele intrări corespunzătoare din anexa I. În cazurile în care se specifică două clasificări diferite la cele două intrări pentru același pericol, se folosește clasificarea care face trimitere la pericolul cel mai grav.

Exemplu:

pentru substanța AB - fără intrare specifică în anexa I:

Intrarea în grupă din anexa I pentru componenții lui A:

Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/22 R33 N; R50-53

Intrarea în grupă din anexa I pentru componenții lui B:

Carc. Cat. 1; R45 T; R23/25 N; R51-53

Clasificarea substanței AB devine astfel:

Carc. Cat. 1; R45 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/25 R33 N; R50-53.

Nota B:

Anumite substanțe (acizi, baze etc.) sunt introduse pe piață în soluție apoasă în diferite concentrații și necesită din această cauză o etichetare diferită, deoarece pericolele pe care le reprezintă variază în funcție de concentrație.

În anexa I, intrările însoțite de nota B au o denumire generală de tipul „acid azotic … %".

În acest caz, producătorul sau orice altă persoană care comercializează o substanță în soluție apoasă trebuie să precizeze pe etichetă concentrația soluției în procente.

Exemplu: acid azotic 45 %.

Cu excepția cazului în care există indicații contrare, procentajul concentrației se stabilește întotdeauna pe bază de greutate/greutate.

Se admite utilizarea datelor suplimentare (de exemplu, greutatea specifică, grade Baumé etc.) sau a frazelor descriptive (de exemplu, concentrat fumant, glacial).

Nota C:

Anumite substanțe organice pot fi comercializate fie sub o formă izomerică bine definită, fie sub formă de amestec de mai mulți izomeri.

În anexa I se folosește uneori o denumire generică de tipul: „xilenol".

În acest caz, producătorul sau orice altă persoană care introduce o astfel de substanță pe piață trebuie să specifice pe etichetă dacă e vorba de: (a) un izomer anume sau (b) un amestec de izomeri.

Exemplu: (a) 2,4-dimetilfenol
(b) xilenol (amestec de izomeri)

Nota D:

Anumite substanțe care se pot polimeriza sau descompune în mod spontan sunt, în general, introduse pe piață sub o formă stabilizată. În anexa I la prezenta directivă, ele sunt incluse sub această formă.

Cu toate acestea, astfel de substanțe sunt uneori introduse pe piață sub o formă nestabilizată. În acest caz, producătorul sau orice altă persoană care introduce o astfel de substanță pe piață trebuie să înscrie pe etichetă numele substanței urmat de mențiunea „nestabilizat(ă)".

Exemplu: acid metacrilic (nestabilizat).

Nota E:

Substanțelor care au efecte specifice asupra sănătății umane (a se vedea capitolul 4 din anexa VI) și care sunt clasificate drept cancerigene, mutagene și toxice pentru reproducere în categoria 1 sau 2 li se atribuie nota, atunci când sunt, de asemenea, clasificate ca fiind foarte toxice (T+), toxice (T) sau nocive (Xn). Pentru aceste substanțe, frazele de risc R20, R21, R22, R23, R24, R25, R26, R27, R28, R39, R68 (nociv), R48 și R65. precum și toate combinațiile acestor fraze de risc sunt precedate de cuvintele „de asemenea".

Exemple: R45-23 „Poate cauza cancer. De asemenea, toxic prin inhalare."
R46-27/28 „Poate provoca modificări genetice ereditare. De asemenea, foarte toxic în contact cu pielea și prin ingerare."

Nota F:

Această substanță poate conține un stabilizant. Dacă stabilizantul modifică proprietățile periculoase ale substanței, astfel cum sunt indicate indicate pe eticheta prevăzută în anexa I, trebuie realizată o etichetă în conformitate cu regulile de etichetare pentru preparatele periculoase.

Nota G:

Această substanță poate fi introdusă pe piață în formă explozivă, caz în care aceasta trebuie evaluată cu ajutorul metodelor de testare adecvate și trebuie prevăzută o etichetă care să indice proprietatea sa explozivă.

Nota H:

Clasificarea și eticheta prezentate pentru această substanță se aplică proprietății sau proprietăților periculoase indicate de fraza sau frazele de risc în combinație cu categoria sau categoriile de pericol menționate. Cerințele articolului 6 din prezenta directivă privind producătorii, distribuitorii și importatorii acestei substanțe se aplică tuturor celorlalte aspecte ale clasificării și etichetării. Eticheta finală respectă cerințele secțiunii 7 din anexa VI la prezenta directivă.

Prezenta notă se aplică anumitor substanțe derivate din cărbune și petrol, precum și anumitor intrări pentru grupe de substanțe din anexa I.

Nota J:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se poate stabili că substanța conține mai puțin de 0,1 % greutate/greutate de benzen (nr. IESCE 200-753-7). Prezenta notă se aplică numai anumitor substanțe complexe derivate din cărbune sau din petrol prezentate în anexa I.

Nota K:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se poate stabili că substanța conține mai puțin de 0,1 % greutate/greutate de 1,3-butadienă (nr. IESCE 203-450-8). Dacă substanța nu este clasificată drept cancerigenă, trebuie să se aplice cel puțin frazele S (2-)9-16. Prezenta notă nu se aplică decât anumitor substanțe complexe derivate din petrol prezentate în anexa I.

Nota L:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se poate stabili că substanța conține mai puțin de 3 % gr extract de DMSO măsurat prin metoda IP 346. Prezenta notă nu se aplică decât anumitor substanțe complexe derivate din petrol prezentate în anexa I.

Nota M:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se poate stabili că substanța conține mai puțin de 0,005 % greutate/greutate de benzo[a]-piren (nr. IESCE 200-028-5). Prezenta notă nu se aplică decât anumitor substanțe complexe derivate din cărbune prezentate în anexa I.

Nota N:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se cunoaște istoricul complet al rafinării și dacă se poate stabili că substanța din care se produce nu este cancerigenă. Prezenta notă nu se aplică decât anumitor substanțe complexe derivate din petrol prezente în anexa I.

Nota P:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se poate stabili că substanța conține mai puțin de 0,1 % greutate/greutate de benzen (nr. IESCE 200-753-7).

Dacă substanța este clasificată drept cancerigenă, se aplică și nota E.

Dacă substanța nu este clasificată drept cancerigenă, se aplică cel puțin frazele S (2-)23-24-62.

Prezenta notă nu se aplică decât anumitor substanțe complexe derivate din petrol prezentate în anexa I.

Nota Q:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică dacă se poate stabili că substanța îndeplinește una din următoarele condiții:

— un test de biopersistență la inhalare, efectuat pe termen scurt, a demonstrat că fibrele mai lungi de 20 de μm au un timp de înjumătățire ponderat mai mic de 10 zile sau

— un test de biopersistență la instilație intratraheală, efectuat pe termen scurt, a demonstrat că fibrele mai lungi de 20 de μm au un timp de înjumătățire ponderat mai mic de 40 zile sau

— un test intraperitoneal adecvat nu a demonstrat exces de cancerogeneză sau

— un test la inhalare, efectuat pe termen lung, a demonstrat absența patogenității sau a modificărilor neoplastice relevante.

Nota R:

Clasificarea drept cancerigenă nu se aplică fibrelor la care media geometrică a diametrelor ponderată cu lungimea minus de două ori eroarea geometrică standard este mai mare de 6 μm.

Nota S:

Pentru această substanță, eticheta menționată la articolul 23 poate să nu fie necesară în anumite cazuri (a se vedea secțiunea 8 din anexa VI).

Explicația notelor referitoare la etichetarea preparatelor

Notele care figurează la dreapta limitelor de concentrație au următoarea semnificație:

Nota 1:

Concentrațiile indicate sau, în absența acestora, concentrațiile generale din Directiva 1999/45/CE reprezintă procente greutatea elementului metalic, calculate în raport cu greutatea totală a preparatului.

Nota 2:

Concentrația de izocianați indicată reprezintă procentul din greutatea monomerului liber, calculat în raport cu greutatea totală a preparatului.

Nota 3:

Concentrația indicată reprezintă procentul din greutatea ionilor de cromat dizolvați în apă, calculat în raport cu greutatea totală a preparatului.

Nota 4:

Preparatele care conțin aceste substanțe sunt clasificate ca nocive și li se atribuie fraza de risc R65 dacă îndeplinesc criteriile de la punctul 3.2.3 din anexa VI.

Nota 5:

Limitele de concentrație pentru preparatele gazoase sunt exprimate în procente de volum/volum.

Nota 6:

Preparatelor care conțin aceste substanțe li se atribuie fraza de risc R67 dacă îndeplinesc criteriile de la punctul 3.2.8 din anexa VI.

Această notă nu se mai aplică de la data la care intră în vigoare criteriile de folosire a frazei de risc R67 stabilite în Directiva 1999/45/CE.

TABLA A — TABEL A — TABELLE A — ΠΙΝΑΚΑΣ A — TABLE A — TABLEAU A — TABELLA A — TABEL A — TABELA A — TABELL A — TAULUKKO A

Lista de los elementos químicos clasificados por su número atómico (Z)
Liste over grundstoffer, ordnet efter deres atomvægt (Z)
Liste der chemischen Elemente, geordnet nach der Ordnungszahl (Z)
Κατάλογος χημικών στοιχείων ταξινομημένων σύμφωνα με τον ατομικό τους αριθμό (Z)
List of chemical elements listed according to their atomic number (Z)
Liste des éléments chimiques classés selon leur numéro atomique (Z)
Elenco degli elementi chimici ordinati secondo il loro numero atomico (Z)
Lijst van chemische elementen, gerangschikt naar atoomgewicht (Z)
Lista dos elementos químicos ordenados segundo o seu número atómico (Z)
Lista över grundämnen, ordnade efter deras atomnummer (Z)
Alkuaineiden luettelo järjestysluvun mukaan (Z)

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

TABLA B/ TABEL B/ TABELLE B/ ΠΙΝΑΚΑΣ B/ TABLE B/ TABLEAU B/ TABELLA B/ TABEL B/ TABELA B/ TABELL B/ TAULUKKO B

Clasificación especial para las sustancias orgánicas
Særlig inddeling af organiske stoffer
Spezielle Anordnung für die organischen Stoffe
Ειδική ταξινόμηση των οργανικών ουσιών
Special classification for organic substances
Classification particulière aux substances organiques
Classificazione speciale per le sostanze organiche
Speciale indeling voor de organische stoffen
Classificação especial para as substâncias orgânicas
Särskild indelning av organiska ämnen
Erityisryhmät orgaanisille aineille

A se vedea Actul de aderare din 2003 (OJ L 236, 23.9.2003, p. 96).

ANEXA 1B

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
004-002-00-2	compuși de beriliu, cu excepția silicaților de aluminiu și beriliu și a acelora specificați în altă parte în prezenta anexă	A E	—	—	Carc. Cat. 2; R49 T+; R26 T; R25-48/23 Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	T+; N R: 49-25-26-36/37/38-43-48/23-51/53 S: 53-45-61		
006-015-00-9	diuron (ISO) 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluree		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-024-00-8	sodium-proxan (ISO) O-izopropilditiocarbonat de sodiu		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		
006-032-00-1	monolinuron (ISO) 3-(4-clorofenil)-1-metoxi-1-metiluree		217-129-5	1746-81-2	Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-48/22-50/53 S: (2-)22-60-61		
006-041-00-0	clorură de dimetilcarbamoil	E	201-208-6	79-44-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R23 Xn; R22 Xi; R36/37/38	T R: 45-22-23-36/37/38 S: 53-45	C ≥ 25 %: T; R45-22-23-36/37/38 20 % ≤ C < 25 %: T; R45-20-36/37/38 3 % ≤ C < 20 %: T; R45-20 0,001 % ≤ C < 3 %: T; R45	
006-069-00-3	metil-tiofanat (ISO) 1,2-di-(3-metoxicarbonil-2-tioureido)benzen		245-740-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20-43-50/53-68 S: (2-)36/37-46-60-61		
007-015-00-1	O-etilhidroxilamină		402-030-3	624-86-2	F; R11 T; R23/24/25-48/23 Xi; R36 R43 N; R50	F; T; N R: 11-23/24/25-36-43-48/23-50 S: (1/2-)16-26-36/37/39-45-60-61		
009-014-00-1	hexafluorosilicat de plumb	E	247-278-1	25808-74-6	Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/22 R33 N; R50-53	T; N R: 61-62-20/22-33-50/53 S: 53-45-60-61		1

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
013-002-00-1	pudră de aluminiu (stabilizată)		231-072-3	—	F; R15 R10	F R: 10-15 S: (2-)7/8-43		
015-003-00-2	fosfură de calciu difosfură tricalcică		215-142-0	1305-99-3	F; R15/29 T+; R28 R50	F; T+; N R: 15/29-28-50 S: (1/2-)22-43-45-61		
015-004-00-8	fosfură de aluminiu		244-088-0	20859-73-8	F; R15/29 T+; R28 R32 N; R50	F; T+; N R: 15/29-28-32-50 S: (1/2-)3/9/14-30-36/37-45-61		
015-005-00-3	fosfură de magneziu difosfură trimagnezică		235-023-7	12057-74-8	F; R15/29 T+; R28 N; R50	F; T+; N R: 15/29-28-50 S: (1/2-)22-43-45-61		
015-006-00-9	difosfură de zinc fosfură de zinc		215-244-5	1314-84-7	F; R15/29 T+; R28 R32 N; R50-53	F; T+; N R: 15/29-28-32-50/53 S: (1/2-)3/9/14-30-36/37-45-60-61		
015-019-00-X	diclorvos (ISO) fosfat de dimetil și 2,2-diclorovinil		200-547-7	62-73-7	T+; R26 T; R24/25 R43 N; R50	T+; N R: 24/25-26-43-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
015-106-00-2	triamidă hexametilfosforică hexametilfosforamidă		211-653-8	680-31-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45	C ≥ 0,1 %: T; R45-46 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
015-121-00-4	Edifenfos (ISO) *S*,*S*-difenilfosforoditioat de *O*-etil		241-178-1	17109-49-8	T; R23/25 Xn; R21 R43 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-43-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
015-137-00-1	pirazofos (ISO) *O*,*O*-dietil *O*-(6-etoxicarbonil-5-metilpirazolo[2,3-a] pirimidin-2-il) fosforotioat		236-656-1	13457-18-6	Xn; R20/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
015-156-00-5	3-[(dimetoxifosfinotioil) oxi]metacrilat de metil[1] metacrifos (ISO) [2] metil(*E*)-3-[(dimetoxifosfinotioil) oxi] metacrilat [2]		250-366-2 [1]- [2]	30864-28-9 [1] 62610-77-9 [2]	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
015-157-00-0	acid fosfonic [1] acid fosforos [2]		233-663-1 [1] 237-066-7 [2]	10294-56-1 [1] 13598-36-2 [2]	Xn; R22 C; R35	C R: 22-35 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
016-002-00-X	sulfură de bariu		244-214-4	21109-95-5	R31 Xn; R20/22 N; R50	Xn; N R: 20/22-31-50 S: (2-)28-61		
016-003-00-5	polisulfuri de bariu		256-814-3	50864-67-0	R31 Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 31-36/37/38-50 S: (2-)28-61		
016-004-00-0	sulfură de calciu		243-873-5	20548-54-3	R31 Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 31-36/37/38-50 S: (2-)28-61		
016-005-00-6	polisulfuri de calciu		215-709-2	1344-81-6	R31 Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 31-36/37/38-50 S: (2-)28-61		
016-011-00-9	dioxid de sulf		231-195-2	7446-09-5	T; R23 C; R34	T R: 23-34 S: (1/2-)9-26-36/37/39-45	C ≥ 20 %: T; R23-34 5 % ≤ C < 20 %: C; R20-34 0,5 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38	5
020-002-00-5	cianură de calciu		209-740-0	592-01-8	T+; R28 R32 N; R50-53	T+; N R: 28-32-50/53 S: (1/2-)7/8-23-36/37-45-60-61		
027-001-00-9	cobalt		231-158-0	7440-48-4	R42/43 R53	Xn R: 42/43-53 S: (2-)22-24-37-61		
027-002-00-4	oxid de cobalt		215-154-6	1307-96-6	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
027-003-00-X	sulfură de cobalt		215-273-3	1317-42-6	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
028-003-00-2	monoxid de nichel		215-215-7	1313-99-1	Carc. Cat. 1; R49 R43 R53	T R: 49-43-53 S: 53-45-61		
028-004-00-8	dioxid de nichel		234-823-3	12035-36-8	Carc. Cat. 1; R49 R43 R53	T R: 49-43-53 S: 53-45-61		
028-005-00-3	trioxid de nichel		215-217-8	1314-06-3	Carc. Cat. 1; R49 R43 R53	T R: 49-43-53 S: 53-45-61		
028-006-00-9	sulfură de nichel		240-841-2	16812-54-7	Carc. Cat. 1; R49 R43 N; R50-53	T; N R: 49-43-50/53 S: 53-45-60-61		
028-007-00-4	subsulfură de nichel disulfură de nichel		234-829-6	12035-72-2	Carc. Cat. 1; R49 R43 N; R51-53	T; N R: 49-43-51/53 S: 53-45-61		
028-008-00-X	hidroxid de nichel		235-008-5	12054-48-7	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-40-43-50/53 S: (2-)22-36-60-61		
034-001-00-2	seleniu		231-957-4	7782-49-2	T; R23/25 R33 R53	T R: 23/25-33-53 S: (1/2-)20/21-28-45-61		
048-010-00-4	sulfură de cadmiu		215-147-8	1306-23-6	Carc. Cat. 3; R40 T; R48/23/25 Xn; R22 R53	T R: 22-40-48/23/25-53 S: (1/2-)22-36/37-45-61	C ≥ 10 %: T; R22-40-48/23/25 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40-48/20/22 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20/22	1
050-003-00-6	acetat de fentin (ISO) acetat de trifenilstaniu		212-984-0	900-95-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R24/25-48/23 Xi; R37/38-41 N; R50-53	T+; N R: 24/25-26-37/38-40-41-48/23-50/53-63 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-60-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
050-004-00-1	hidroxid de fentin (ISO) hidroxid de trifenilstaniu		200-990-6	76-87-9	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R24/25-48/23 Xi; R37/38-41 N; R50-53	T+; N R: 24/25-26-37/38-40-41-48/23-50/53-63 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-60-61		
050-013-00-0	derivați de trioctilstaniu, cu excepția celor specificați în altă parte în prezenta anexă	A	—	—	Xi; R36/37/38 R53	Xi R: 36/37/38-53 S: (2-)61	C ≥ 1 %: Xi; R36/37/38	1
078-001-00-0	tetracloroplatinați, cu excepția celor specificați în altă parte în prezenta anexă	A	—	—	T; R25 Xi; R41 R42/43	T R: 25-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39-45		
078-005-00-2	hexacloroplatinați, cu excepția celor specificați în altă parte în prezenta anexă	A	—	—	T; R25 Xi; R41 R42/43	T R: 25-41-42/43 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45		
081-001-00-3	taliu		231-138-1	7440-28-0	T+; R26/28 R33 R53	T+ R: 26/28-33-53 S: (1/2-)13-28-45-61		
092-001-00-8	uraniu		231-170-6	7440-61-1	T+; R26/28 R33 R53	T+ R: 26/28-33-53 S: (1/2-)20/21-45-61		
601-004-01-8	butan [cu un conținut ≥ 0,1 % butadienă (203-450-8)] [1] izobutan [cu un conținut ≥ 0,1 % butadienă (203-450-8)] [2]	C S	203-448-7 [1] 200-857-2 [2]	106-97-8 [1] 75-28-5 [2]	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 45-46-12 S: 53-45		
601-005-00-6	2,2-dimetilpropan neopentan		207-343-7	463-82-1	F+; R12 N; R51-53	F+; N R: 12-51/53 S: (2-)9-16-33-61		
601-007-00-7	hexan, amestec de izomeri [cu un conținut < 5 % *n*-hexan (203-777-6)]	C	—	—	F; R11 Xn; R65 Xi; R38 R67 N; R51-53	F; Xn; N R: 11-38-51/53-65-67 S: (2-)9-16-29-33-61-62		4 6

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
601-013-00-X	1,3-butadienă buta-1,3-dienă	D	203-450-8	106-99-0	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 45-46-12 S: 53-45		
601-041-00-2	dibenz[*a*,*h*]antracen		200-181-8	53-70-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 0,01 %: T; R45	
602-027-00-9	tricloretilenă tricloretenă		201-167-4	79-01-6	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 R67 Xi; R36/38 R52-53	T R: 45-36/38-52/53-67 S: 53-45-61		6
602-037-00-3	α-clorotoluen clorură de benzil	E	202-853-6	100-44-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R23 Xn; R22-48/22 Xi; R37/38-41	T R: 45-22-23-37/38-41-48/22 S: 53-45		
602-073-00-X	1,4-diclorobut-2-enă	E	212-121-8	764-41-0	Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50-53	T+; N R: 45-24/25-26-34-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; R45-24/25-26-34 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-21/22-26-34 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-21/22-26-36/37/38 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-21/22-23-36/37/38 3 % ≤ C < 5 %: T; R45-21/22-23 1 % ≤ C < 3 %: T; R45-23 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
602-076-00-6	2,3,4-triclorobut-1-enă		219-397-9	2431-50-7	Carc. Cat 3; R40 T; R23 Xn; R22 Xi; R36/37/38 N; R50-53	T; N R: 22-23-36/37/38-40-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T; R22-23-36/37/38-40 20 % ≤ C < 25 %: Xn; R20-36/37/38-40 3 % ≤ C < 20 %: Xn; R20-40 0,1 % ≤ C < 3 %: Xn; R40	
602-084-00-X	1,1-dicloro-1-fluoroetan		404-080-1	1717-00-6	R52-53 N; R59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-014-00-0	2-butoxietanol eter monobutilic al etilenglicolului butil celosolv		203-905-0	111-76-2	Xn; R20/21/22 Xi; R36/38	Xn R: 20/21/22-36/38 S: (2-)36/37-46		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-024-00-5	1,4-dioxan	D	204-661-8	123-91-1	F; R11-19 Carc. Cat. 3; R40 Xi; R36/37 R66	F; Xn R: 11-19-36/37-40-66 S: (2-)9-16-36/37-46		
603-038-00-1	alil-glicidil eter alil-2,3-epoxipropil eter prop-2-en-1-il-2,3-epoxipropil eter		203-442-4	106-92-3	R10 Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/22 Xi; R37/38-41 R43 R52-53	Xn R: 10-20/22-37/38-40-41-43-52/53-62-68 S: (2-)24/25-26-36/37/39-61		
603-039-00-7	butil-glicidil eter butil-2,3-epoxipropil eter		219-376-4	2426-08-6	R10 Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22 Xi; R37 R43 R52-53	Xn R: 10-20/22-37-40-43-52/53-68 S: (2-)24/25-36/37-61		
603-044-00-4	dicofol (ISO) 2,2,2-tricloro-1,2-bis(4-clorofenil)etanol		204-082-0	115-32-2	Xn; R21/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
603-046-00-5	bis(clorometil)eter oxibis(clorometan)	E	208-832-8	542-88-1	R10 Carc. Cat. 1; R45 T+; R26 T; R24 Xn; R22	T+ R: 45-10-22-24-26 S: 53-45	C ≥ 25 %: T+; R45-22-24-26 7 % ≤ C < 25 %: T+; R45-21-26 3 % ≤ C < 7 %: T; R45-21-23 1 % ≤ C < 3 %: T; R45-23 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,001 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
603-049-00-1	clorfenetol (ISO) 1,1-bis(4-clorofenil) etanol		201-246-3	80-06-8	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)36-61		
603-055-00-4	propilen oxid 1,2-epoxipropan metiloxiran	E	200-879-2	75-56-9	F+; R12 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Xn; R20/21/22 Xi; R36/37/38	F+; T R: 45-46-12-20/21/22-36/37/38 S: 53-45		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-065-00-9	eter diglicidilic al rezorcinolului 1,3-bis(2,3-epoxipropoxi) benzen		202-987-5	101-90-6	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R21/22 Xi; R36/38 R43 R52-53	Xn R: 21/22-36/38-40-43-52/53-68 S: (2-)23-36/37-61		
603-067-00-X	fenil-glicidil eter 2,3-epoxipropil-fenil eter 1,2-epoxi-3-fenoxipropan	E	204-557-2	122-60-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R37/38 R43 R52-53	T R: 45-20-37/38-43-52/53 S: 53-45-61		
603-085-00-8	bronopol (INN) 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol		200-143-0	52-51-7	Xn; R21/22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 21/22-37/38-41-50 S: (2-)26-37/39-61		
603-091-00-0	*exo*-1-metil-4-(1-metiletil)-7-oxabiciclo[2.2.1]heptan-2-ol		402-470-6	87172-89-2	Xn; R22 Xi; R41	Xn R: 22-41 S: (2-)26-39		
604-011-00-7	2,4-diclorofenol		204-429-6	120-83-2	T; R24 Xn; R22 C; R34 N; R51-53	T; N R: 22-24-34-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
604-021-00-1	2-bifenilat de sodiu sarea de sodiu a 2-fenilfenolului		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 22-37/38-41-50 S: (2-)22-26-61		
604-038-00-4	4-cloro-3,5-dimetilfenol[1] cloroxilenol [2]		201-793-8 [1] 215-316-6 [2]	88-04-0 [1] 1321-23-9 [2]	Xn; R22 Xi; R36/38 R43	Xn R: 22-36/38-43 S: (2-)24-37		
605-008-00-3	acrilaldehidă acroleină prop-2-enal	D	203-453-4	107-02-8	F; R11 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50	F; T+; N R: 11-24/25-26-34-50 S: 23-26-28-36/37/39-45-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
605-009-00-9	crotonaldehidă [1] 2-butenal [1] (*E*)-2-butenal [2] (*E*)-crotonaldehidă [2]		224-030-0 [1] 204-647-1 [2]	4170-30-3 [1] 123-73-9 [2]	F; R11 Muta. Cat. 3; R68 T+; R26 T; R24/25 Xn; R48/22 Xi; R37/38-41 N; R50	F; T+; N R: 11-24/25-26-37/38-41-48/22-50-68 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61		
607-004-00-7	acid tricloroacetic		200-927-2	76-03-9	C; R35 N; R50-53	C; N R: 35-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 10 %: C; R35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38	
607-005-00-2	TCA-sodiu (ISO) tricloroacetat de sodiu		211-479-2	650-51-1	Xi; R37 N; R50-53	Xi; N R: 37-50/53 S: (2-)46-60-61		
607-035-00-6	metacrilat de metil 2-metilprop-2-enoat de metil 2-metilpropenoat de metil	D	201-297-1	80-62-6	F; R11 Xi; R37/38 R43	F; Xi R: 11-37/38-43 S: (2-)24-37-46		
607-039-00-8	2,4-D (ISO) acid 2,4-diclorofenoxiacetic		202-361-1	94-75-7	Xn; R22 Xi; R37-41 R43 R52-53	Xn R: 22-37-41-43-52/53 S: (2-)24/25-26-36/37/39-46-61		
607-040-00-3	săruri ale 2,4-D	A	—	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24/25-26-36/37/39-46-61		
607-043-00-X	dicamba (ISO) acid 2,5-dicloro-6-metoxi-benzoic acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoic		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-061-00-8	acid acrilic acid prop-2-enoic	D	201-177-9	79-10-7	R10 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50	C; N R: 10-20/21/22-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C; R20/21/22-35 10 % ≤ C < 25 %: C; R35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38	
607-083-00-8	2,4-DB (ISO) acid 4-(2,4-diclorofenoxi) butiric		202-366-9	94-82-6	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)25-29-46-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-084-00-3	săruri ale 2,4-DB	A	—	—	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)26-29-39-46-61		
607-088-00-5	acid metacrilic acid 2-metilpropenoic	D	201-204-4	79-41-4	Xn; R21/22 C; R35	C R: 21/22-35 S: (1/2-)26-36/37/39-45	C ≥ 25 %: C; R21/22-35 10 % ≤ C < 25 %: C; R35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38	
607-133-00-9	esteri monoalchilici sau monoarilici sau monoalchilarilici ai acidului acrilic, cu excepția celor specificați în altă parte în prezenta anexă	A	—	—	Xi; R36/37/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-51/53 S: (2-)26-28-61	C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38	
607-134-00-4	esteri monoalchilici sau monoarilici sau monoalchilarilici ai acidului metacrilic, cu excepția celor specificați în altă parte în prezenta anexă	A	—	—	Xi; R36/37/38	Xi R: 36/37/38 S: (2-)26-28	C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38	
607-288-00-2	(*c*-(3-(1-(3-(*e*-6-dicloro-5-cianipiridin-f-il(metil)amino)propil)-1,6-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridilază)-4-sulfonato-fenilsulfamoil)ftalocianină-*a,b,d*-trisulfonato(6-)) nichelato II de tetrasodiu, unde *a* este 1 sau 2 sau 3 sau 4, b este 8 sau 9 sau 10 sau 11, *c* este 15 sau 16 sau 17 sau 18, *d* este 22 sau 23 sau 24 sau 25 și unde *e* și *f* împreună sunt 2 și 4 și respectiv 4 și 2.		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37-61		
607-300-00-6	[2-(5-cloro-2,6-difluoropirimidin-4-ilamino)-5-(*b*-sulfamoil-*c,d*-sulfonatoftalocianin-*a*-il-*K*4,*N*29,*N*30,*N*31,*N*32-sulfonil-amino)benzoato (5-)] cuprat(II) de trisodiu unde *a* = 1,2,3,4; *b* = 8,9,10,11; *c* = 15,16,17,18; *d* = 22,23,24,25		411-430-7	—	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)26-36/37/39		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
608-001-00-3	acetonitril cianometan		200-835-2	75-05-8	F; R11 Xn; R20/21/22 Xi; R36	F; Xn R: 11-20/21/22-36 S: (1/2-)16-36/37		
608-007-00-6	ioxinil (ISO) 4-hidroxi-3,5-diiodobenzonitril		216-881-1	1689-83-4	Repr. Cat. 3; R63 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-25-50/53-63 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
608-014-00-4	clorotalonil (ISO) tetracloroizoftalonitril		217-588-1	1897-45-6	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
608-015-00-X	diclobenil (ISO) 2,6-diclorobenzonitril		214-787-5	1194-65-6	Xn; R21 N; R51-53	Xn; N R: 21-51/53 S: (2-)36/37-61		
608-017-00-0	octanoat de bromoxinil (ISO) octanoat de 2,6-dibromo-4-cianofenil		216-885-3	1689-99-2	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		
608-018-00-6	octanoat de ioxinil (ISO) octanoat de 4-ciano-2,6-diiodofenil		223-375-4	3861-47-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		
609-016-00-8	dinitrofenol [1] 2,4(sau 2,6)-dinitrofenol [2]		247-096-2 [1] 275-732-9 [2]	25550-58-7 [1] 71629-74-8 [2]	T; R23/24/25 R33 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-33-50/53 S: (1/2-)28-37-45-60-61		
609-021-00-5	sarea de sodiu a DNOC [1] 4,6-dinitro-*o*-cresolat de sodiu [1]sarea de potasiu a DNOC [2] 4,6-dinitro-*o*-cresolat de potasiu [2]		219-007-7 [1] - [2]	2312-76-7 [1] 5787-96-2 [2]	T; R23/24/25 R33 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-33-50/53 S: (1/2-)13-45-60-61		
609-022-00-0	sarea de amoniu a DNOC amonium 4,6-dinitro-*o*-tolil oxid de amoniu		221-037-0	2980-64-5	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61		
609-024-00-1	binapacril (ISO) crotonat de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenil-3-metil	E	207-612-9	485-31-4	Repr. Cat. 2; R61 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 61-21/22-50/53 S: 53-45-60-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
609-026-00-2	săruri și esteri de dinoseb, cu excepția celor specificate(ți) în altă parte din prezenta anexă	A E	—	—	R44 Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 T; R24/25 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 61-62-24/25-36-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-027-00-8	dinicton amestec de izomeri: carbonat de metil-2-octil-4,6-dinitrofenil, carbonat de metil-4-octil-4,6-dinitrofenil		—	63919-26-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
609-028-00-3	dinex 2-ciclohexil-4,6-dinitrofenol		205-042-5	131-89-5	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)13-45-60-61		
609-029-00-9	săruri și esteri ai dinexului	A	—	—	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)13-45-60-61		
609-032-00-5	bromofenoxim (ISO) 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehidă-O-(2,4-dini-trofenil)-oximă		236-129-6	13181-17-4	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)25-60-61		
609-033-00-0	dinosam 2-(1-metilbutil)-4,6-dinitrofenol		—	4097-36-3	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)13-45-60-61		
609-034-00-6	săruri și esteri ai dinosamului	A	—	—	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)13-45-60-61		
609-042-00-X	pendimetalin (ISO) *N*-(1-etilpropil)-2,6-dinitro -3,4-xilidină		254-938-2	40487-42-1	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-29-37-60-61		
609-045-00-6	amestec de: carbonat de 4,6-dinitro-2-(3-octil) fenilmetil și carbonat de 4,6-dinitro-2-(4-octil) fenilmetil dinocton-6		—	8069-76-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
609-046-00-1	trifluralin (ISO) (conține < 0,5 ppm NPDA) α,α,α-trifluoro-2,6-dinitro-*N*,*N*-dipropil-p-toluidină (conține < 0,5 ppm NPDA) 2,6-dinitro- *N*,*N*-dipropil-4-trifluorometilanilină (conține < 0,5 ppm NPDA) *N*,*N*-dipropil-2,6-dinitro-4-trifluorometilanilină (conține < 0,5 ppm NPDA)		216-428-8	1582-09-8	Xi; R36 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-053-00-X	trinitrometan hidrazină	E	414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
611-003-00-7	fenaminosulf (ISO) 4-dimetilaminobenzen-diazosulfonat de sodiu		205-419-4	140-56-7	T; R25 Xn; R21 R52-53	T R: 21-25-52/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
612-023-00-9	fenilhidrazină [1] clorură de fenilhidrazină [2] hidroclorură de fenilhidrazină [3] sulfat de fenilhidrazină (2:1) [4]	E	202-873-5 [1] 200-444-7 [2] 248-259-0 [3] 257-622-2 [4]	100-63-0 [1] 59-88-1 [2] 27140-08-5 [3] 52033-74-6 [4]	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25-48/23/24/25 Xi; R36/38 R43 N; R50	T; N R: 45-23/24/25-36/38-43-48/23/24/25-50 S: 53-45-61		
612-024-00-4	*m*-toluidină 3-aminotoluen		203-583-1	108-44-1	T; R23/24/25 R33 N; R50	T; N R: 23/24/25-33-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
612-027-00-0	xilidine, cu excepția celor specificate în altă parte în prezenta anexă dimetil aniline, cu excepția celor specificate în altă parte în prezenta anexă	C	—	—	T; R23/24/25 R33 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
612-077-00-3	dimetilnitrozoamină *N*-nitrozodimetilamină	E	200-549-8	62-75-9	Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R25-48/25 N; R51-53	T+; N R: 45-25-26-48/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T+; R45-25-26-48/25 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-48/25 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-22-26-48/22 3 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-48/22 1 % < C < 3 %: T; R45-23-48/22 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,001 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
612-083-00-6	1-metil-3-nitro-1-nitrozoguanidină	E	200-730-1	70-25-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R20 Xi; R36/38 N; R51-53	T; N R: 45-20-36/38-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T+; R45-20-36/38 20 % < C < 25 %: T+; R45-36/38 0,01 % ≤ C < 20 %: T; R45	
612-088-00-3	simazină (ISO) 6-cloro-*N*,*N*′-dietil-1,3,5-triazin-2,4-diamină		204-535-2	122-34-9	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
612-098-00-8	nitrozodipropilamină	E	210-698-0	621-64-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61	C > 25 %: T+; R45-22 0,001 % < C < 25 %: T; R45	
613-025-00-2	cinerin I 2,2-dimetil-3-(2-metil-prop-1-enil) ciclopropancarboxilat de 3-but-2-enil)-2-metil-4-oxociclopent-2-enil		246-948-0	25402-06-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-026-00-8	cinerin II 2,2-dimetil-3-(3-metoxi-2-metil-3-oxoprop-1-enil) ciclopropancarboxilat de 3-but-2-enil)-2-metil-4-oxociclopent-2-enil		204-454-2	121-20-0	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-033-00-6	2-metilaziridină propilenimină	E	200-878-7	75-55-8	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T+; R26/27/28 Xi; R41 N; R51-53	F; T+; N R: 45-11-26/27/28-41-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 10 %: T+; R45-26/27/28-41 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-26/27/28-36 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-23/24/25-36 1 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
613-042-00-5	imazalil (ISO) 1-[2-(aliloxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1 *H*-imidazol		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-044-00-6	captan (ISO) 1,2,3,6-tetrahidro-*N*-(triclorometiltio)ftalimidă		205-087-0	133-06-2	Carc. Cat. 3; R40 T; R23 Xi; R41 R43 N; R50	T; N R: 23-40-41-43-50 S: (1/2-)26-29-36/37/39-45-61		
613-045-00-1	folpet (ISO) *N*-(triclorometiltio)ftalimidă		205-088-6	133-07-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36 R43 N; R50	Xn; N R: 20-36-40-43-50 S: (2-)36/37-46-61		
613-068-00-7	atrazină (ISO) 2-cloro-4-etilamină-6-izopropilamină-1,3,5-triazină		217-617-8	1912-24-9	Xn; R48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 43-48/22-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
613-070-00-8	propilentiouree		—	2122-19-2	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53-63 S: (2-)36/37-46-61		
613-090-00-7	duclorură de paraquat [1] diclorură de 1,1-dimetil-4,4′-bipiridiniu [1] dimetilsulfat de paraquat [2] dimetilsulfat de 1,1-dimetil-4,4′-bipiridiniu [2]		217-615-7 [1] 218-196-3 [2]	1910-42-5 [1] 2074-50-2 [2]	T+; R26 T; R24/25-48/25 Xi; R36/37/38 N; R50-53	T+; N R: 24/25-26-36/37/38-48/25-50/53 S: (1/2-)22-28-36/37/39-45-60-61		
613-116-00-7	tolilfluanid (ISO) dicloro-*N*-[(dimetilamino) sulfonil]fluoro-*N*-(*p*-tolil) metansulfenamidă		211-986-9	731-27-1	T; R23 Xn; R48/20 Xi; R36/37/38 R43 N; R50-53	T; N R: 23-36/37/38-43-48/20-50/53 S: (1/2-)24-26-37-38-45-60-61		

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
615-005-00-9	4,4′-metilendifenil diizocianat [1] difenilmetan-4,4′-diizocianat [1] 2,2′-metilendifenil diizocianat [2] difenilmetan-2,2′-diizocianat [2] *o*-(*p*-izocianatobenzil)fenil izocianat [3] difenilmetan-2,4′-diizocianat [4] metilendifenil diizocianat [4]	C	202-966-0 [1] 219-799-4 [2] 227-534-9 [3] 247-714-0 [4]	101-68-8 [1] 2536-05-2 [2] 5873-54-1 [3] 26447-40-5 [4]	Xn; R20 Xi; R36/37/38 R42/43	Xn R: 20-36/37/38-42/43 S: (1/2-)23-36/37-45	C ≥ 25 %: Xn; R20-36/37/38-42/43 5 % ≤ C < 25 %: Xn; R36/37/38-42/43 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R42/43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R42	2
616-003-00-0	acrilamidă prop-2-enamidă	D E	201-173-7	79-06-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 3; R62 T; R25-48/23/24/25 Xn; R20/21 Xi; R36/38 R43	T R: 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62 S: 53-45		
616-004-00-6	alidoclor (ISO) *N*,*N*-dialilcloroacetamidă		202-270-7	93-71-0	Xn; R21/22 Xi; R36/38 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-36/38-51/53 S: (2-)26-28-36/37/39-61		
616-007-00-2	difenamid (ISO) *N*,*N*-dimetil-2,2-difenilacetamidă		213-482-4	957-51-7	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
616-008-00-8	propaclor (ISO) 2-cloro-*N*-izopropilacetanilidăα-cloro-*N*-izopropilacetanilidă		217-638-2	1918-16-7	Xn; R22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-009-00-3	propanil (ISO) 3′,4′-dicloropropionanilidă		211-914-6	709-98-8	Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-50 S: (2-)22-61		
616-011-00-4	*N*,*N*-dimetilacetamidă	E	204-826-4	127-19-5	Repr. Cat. 2; R61 Xn; R20/21	T R: 61-20/21 S: 53-45	C ≥ 25 %: T; R61-20/21 5 % ≤ C < 25 %: T; R61	

Nr. de index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
616-014-00-0	2-butanon-oximă etil-metil-cetoximă etil-metil-cetonă-oximă		202-496-6	96-29-7	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21 Xi; R41 R43	Xn R: 21-40-41-43 S: (2-)13-23-26-36/37/39		
616-015-00-6	alaclor (ISO) 2-cloro-2′,6′-dietil-*N*-(metoximetil)acetanilidă		240-110-8	15972-60-8	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61		
616-017-00-7	hidroclorură de cartap		239-309-2	15263-52-2	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
616-018-00-2	*N*,*N*-dietil-*m*-toluamidă		205-149-7	134-62-3	Xn; R22 Xi; R36/38 R52-53	Xn R: 22-36/38-52/53 S: (2-)61		
616-020-00-3	tebutiuron (ISO) 1-(5-*terț*-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetiluree		251-793-7	34014-18-1	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)37-60-61		
616-021-00-9	tiazfluron (ISO) 1,3-dimetil-1-(5-trifluorometil-1,3,4-tiadiazol-2-il) uree		246-901-4	25366-23-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
616-025-00-0	valinamidă		402-840-7	20108-78-5	Repr. Cat. 3; R62 Xi; R36 R43	Xn R: 36-43-62 S: (2-)26-36/37		
650-013-00-6	azbest	E	— — — — — — —	12001-28-4 132207-32-0 12172-73-5 77536-66-4 77536-68-6 77536-67-5 12001-29-5	Carc. Cat. 1; R45 T; R48/23	T R: 45-48/23 S: 53-45		

ANEXA 1C

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
004-003-00-8	oxid de beriliu	E	215-133-1	1304-56-9	Carc. Cat. 2; R49 T+; R26 T; R25-48/23 Xi; R36/37/38 R43	T+ R: 49-25-26-36/37/38-43-48/23 S: 53-45		
007-025-00-6	hidroclorură de (4-hidrazinofenil)-*N*-metilmetan-sulfonamidă		406-090-1	81880-96-8	Muta. Cat. 3; R68 T; R25-48/25 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/25-68-50/53 S: (1/2-)22-36/37/39-45-60-61		
007-026-00-1	oxo-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)carbonilacetohidrazidă		413-230-5	122035-71-6	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)8-22-24-26-30-37/39		
007-027-00-7	1,6-bis(3,3-bis((1-metil-pentilidenimino)propil) ureido)hexan		420-190-2	—	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)7-26-36/37/39-45-60-61		
013-008-00-4	iodură de di-*n*-octilaluminiu		408-190-0	7585-14-0	R14 F; R17 C; R34 N; R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-)6-16-26-36/37/39-43-45-60-61		
014-017-00-6	flusilazol (ISO) bis(4-fluorofenil)(metil) (1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil)silan	E	—	85509-19-9	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 61-22-40-51/53 S: 53-45-61		
014-018-00-1	octametilciclotetrasiloxan		209-136-7	556-67-2	Repr. Cat. 3; R62 R53	Xn R: 53-62 S: (2-)36/37-46-51-61		
014-019-00-7	amestec de: 4-[[bis-(4-fluorofenil)metilsilil]metil]-4*H*-1,2,4-triazol; 1-[[bis-(4-fluorofenil)metilsilil] metil] -1*H*-1,2,4-triazol	E	403-250-2	—	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 61-22-40-51/53 S: 53-45-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
014-020-00-2	bis(1,1-dimetil-2-propiniloxi)dimetilsilan		414-960-7	53863-99-3	Xn; R20	Xn R: 20 S: (2)		
014-021-00-8	tris(izopropeniloxi)fenilsilan		411-340-8	52301-18-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
014-022-00-3	produși de reacție a: (2-hidroxi-4-(3-propenoxi)benzofenonei și trietoxisilanului cu produsul de hidroliză al silicei și metiltrimetoxisilanului		401-530-9	—	F; R11 T; R39/23/24/25 Xn; R20/21/22	F; T R: 11-20/21/22-39/23/24/25 S: (1/2-)16-29-36/37-45		
014-023-00-9	α,ω-dihidroxipoli(hex-5-en-1-ilmetilsiloxan)		408-160-7	125613-45-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
014-024-00-4	1-((3-(3-cloro-4-fluorofenil)propil)dimetilsilanil)-4-etoxibenzen		412-620-2	121626-74-2	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
014-025-00-X	4-[3-(dietoximetilsililpropoxi)-2,2,6,6-tetrametil]piperidină		411-400-3	102089-33-8	Xn; R22-48/21 Xi; R38-41 R52-53	Xn R: 22-38-41-48/21-52/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
015-168-00-0	fostiazat (ISO) (*RS*)-*S*-*sec*-butil-*O*-etil-2-oxo-1,3-tiazolidin-3-il fosfonotioat		—	98886-44-3	T; R23/25-39 Xn; R21 Xi; R41 R43 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-39-41-43-50/53 S: (1/2-)53-45-25-26-39-60-61		
015-169-00-6	tetrafluoroborat de tributiltetradecilfosfoniu		413-520-1	—	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-60-61		
015-170-00-1	amestec de: octilfosfat de di-(1-octan-*N*,*N*,*N*-trimetilamoniu; dioctilfosfat de 1-octan-*N*,*N*,*N*-trimetilamoniu; octilfosfat de 1-octan-*N*,*N*,*N*-trimetilamoniu		407-490-9	—	Xn; R21/22 C; R34	C R: 21/22-34 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
015-171-00-7	fosforotioat de *O*,*O*,*O*-tris(2(sau 4)-C_{9-10}-izoalchilfenil)		406-940-1	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
015-172-00-2	amestec de: fosfat de bis(izotrideciamoniu)mono(di-(4-metilpent-2-iloxi)tiofosforotionilizopropil); fosfat de izotridecamoniu bis(di-(4-metilpent-2-iloxi)tiofosforotionilizopropil)		406-240-6	—	R10 C; R34 N; R51-53	C; N R: 10-34-51/53 S: (1/2-)23-26-28-36/37/39-45-61		
015-173-00-8	fosfonotioat de metil[2-(1,1-dimetiletil)-6-metoxipirimidin-4-il]etil		414-080-3	117291-73-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)23-36-60-61		
015-174-00-3	1-cloro-*N*,*N*-dietil-1,1-difenil-1-(fenilmetil) fosforamină		411-370-1	82857-68-9	T; R25 Xi; R41 N; R51-53	T; N R: 25-41-51/53 S: (1/2-)26-37/39-41-45-61		
015-175-00-9	*terț*-butil-(trifenilfosforaniliden) acetat		412-880-7	35000-38-5	T; R25 Xn; R48/22 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 25-36-43-48/22-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
015-176-00-4	*P*,*P*,*P*′,*P*′-tetracis-(o-metoxifenil)propan-1,3-difosfină		413-430-2	116163-96-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
015-177-00-X	acid ((4-fenilbutil)hidroxifosforil)acetic		412-170-7	83623-61-4	Xn; R48/22 Xi; R41 R43	Xn R: 41-43-48/22 S: (2-)22-26-36/37/39		
015-178-00-5	fosfonat de (*R*)-α-feniletilamoniu (-)-(1*R*, 2*S*)-(1,2-epoxipropil) monohidrat		418-570-8	25383-07-7	Repr. Cat. 3; R62 N; R51-53	Xn; N R: 62-51/53 S: (2-)22-36/37-61		
015-179-00-0	produs de condensare UVCB a: clorurii de tetracishidroximetilfosfoniu, ureei și alchilaminei C_{16-18} din seu, hidrogenată distilată		422-720-8	166242-53-1	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-68-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
016-063-00-2	metabisulfit de sodiu		231-673-0	7681-57-4	Xn; R22 Xi; R41 R31	Xn R: 22-31-41 S: (2-)26-39-46		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
016-072-00-1	3-amino-4-hidroxi-*N*-(2-metoxietil)-benzen-sulfonamidă		411-520-6	112195-27-4	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
016-073-00-7	tetracis(fenilmetil)tioperoxid(carbotioamidă)		404-310-0	10591-85-2	R53	R: 53 S: 61		
016-074-00-2	6-fluoro-2-metil-3-(4-metiltiobenzil)inden		405-410-7	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
016-075-00-8	2,2′-dialil-4,4′-sulfonildifenol		411-570-9	41481-66-7	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
016-076-00-3	2,3-bis((2-mercaptoetil) tio)-1-propantiol		411-290-7	131538-00-6	Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-48/22-50/53 S: (2-)23-24/25-36-60-61		
016-077-00-9	sulfoclorură de 2-cloro-*p*-toluen		412-890-1	42413-03-6	C; R34 R43 R52-53	C R: 34-43-52/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
016-078-00-4	4-metil-*N*,*N*-bis(2-(((4-metilfenil)sulfonil)amino)etil)-*p*-toluensulfonamidă		413-300-5	56187-04-3	R53	R: 53 S: 61		
016-079-00-X	*N*,*N*-bis(2-(p-toluensulfoniloxi)etil)-p-toluensulfonamidă		412-920-3	16695-22-0	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
016-080-00-5	2-anilino-5-(2-nitro-4-(*N*-fenilsulfamoil))anilino benzensulfonat de sodiu		412-320-1	31361-99-6	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
016-081-00-0	hexahidrociclopenta[*c*] pirol-1-(1*H*)-amoniu *N*-etoxicarbonil-*N*-(*p*-tolilsulfonil)azanidă		418-350-1	—	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R22 Xi; R36 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-43-68-51/53 S: (2-)26-36/37-61		
016-082-00-6	etoxisulfuron 1-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-3-(2-etoxifenoxisulfonil)uree		—	126801-58-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
016-083-00-1	acibenzolar-*S*-metil esterul *S*-metilic al acidului benzo[1,2,3] tia-diazol-7-carbotioic		420-050-0	135158-54-2	Xi; R36/37/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/37/38-43-50/53 S: (2-)24/25-37-46-59-60-61		
016-084-00-7	prosulfuron 1-(4-metoxi-6-metil-1,3-5-triazin-2-il)-3-[2-(3,3,3-trifluoropropil) fenilsulfonil]uree		—	94125-34-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
016-085-00-2	flazasulfuron 1-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-3-(3-trifluorometil-2-piridilsulfonil)uree		—	104040-78-0	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
022-003-00-6	bis(η^5-ciclopentadienil)-bis(2,6-difluoro-3-[pirol-1-il]fenil)titaniu		412-000-1	125051-32-3	F; R11 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R48/22 N; R51-53	F; Xn; N R: 11-48/22-62-51/53 S: (2-)7-22-33-36/37-61		
024-018-00-3	cromat de sodiu	E	231-889-5	7775-11-3	Carc. Cat. 2; R49 Muta. Cat. 2; R46 T+; R26 T; R25 Xn; R21 Xi; R37/38-41 R43 N; R50-53	T+; N R: 49-46-21-25-26-37/38-41-43-50/53 S: 53-45-60-61	C >≥ 7 %: T+; R49-46-21-25-26-37/38-41-43 0,5 % ≤ C < 7 %: T; R49-46-43 0,1 % ≤ C < 0,5 %: T; R49-46	3
025-004-00-X	di(hexafluorofosfat) de bis (*N*,*N*′,*N*′′-trimetil-1,4,7-triazaciclononan)-trioxo-dimangan(IV) monohidrat		411-760-1	116633-53-5	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
026-001-00-6	hexafluoroantimonat de (η-cumen)-(η-ciclopentadienil) fier(II)		407-840-0	100011-37-8	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
026-002-00-1	trifluorometan-sulfonat de (η-cumen)-(η-ciclopentadienil) fier(II)		407-880-9	117549-13-0	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)26-61		
029-009-00-7	complex ftalocianin-*N*-[3-(dietilamino)propil] sulfon amidă cupru		413-650-9	93971-95-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
029-010-00-3	amestec de derivați de (dodecakis(*p*-toliltio)ftalocianato)cupru(II) până la (hexadecakis(*p*-toliltio)ftalocianato)cupru(II)		407-700-9	101408-30-4	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
029-011-00-9	[29*H*,31*H*-ftalocianato-(2)-*N*29,*N*30,*N*31,*N*32]-((3-*N*-metil-*N*-(2-hidroxietil) amino)propil)amino)sulfonilsulfonato de sodiu, complexul cu cuprul		412-730-0	150522-10-4	C; R34	C R: 34 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45		
033-007-00-2	*terț*-butilarsină		423-320-6	4262-43-5	F; R17 T+; R26	F; T+ R: 17-26 S: (1/2-)9-28-36/37-43-45		
035-004-00-1	perbromură de 2-hidroxietilamoniu		407-440-6	—	O; R8 Xn; R22 C; R35 R43 N; R50	O; C; N R: 8-22-35-43-50 S: (1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-60-61		
042-004-00-5	produsul de reacție al molibdatului de amoniu cu alchilamină dietoxilată C_{12-24} (1:5-1:3)		412-780-3	—	Xi; R38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-43-51/53 S: 24/25-37-61		
050-020-00-9	trioctilstanan		413-320-4	869-59-0	T; R48/25 Xi; R38 R53	T R: 38-48/25-53 S: (1/2-)23-36/37-45-61		
072-001-00-4	tetra-*n*-butoxid de hafniu		411-740-2	22411-22-9	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24/25-26-37/39		
074-001-00-X	dihidrogendodecawolframat de hexasodiu		412-770-9	12141-67-2	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
074-002-00-5	produse de reacție ale hexaclorurii de tungsten cu 2-metilpropan-2-ol, nonilfenol și pentan-2,4-dionă		408-250-6	—	F; R11 Xn; R20 C; R34 R43 N; R50-53	F; C; N R: 11-20-34-43-50/53 S: (1/2-)16-26-29-33-36/37/39-45-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
601-052-00-2	naftalen		202-049-5	91-20-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
601-053-00-8	nonilfenol [1] 4-nonilfenol ramificat [2]		246-672-0 [1] 284-325-5 [2]	25154-52-3 [1] 84852-15-3 [2]	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
601-054-00-3	amestec de izomeri de: dibenzilbenzen; dibenzil(metil)benzen; dibenzil(dimetil)benzen; dibenzil(trimetil)benzen		405-570-8	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
601-055-00-9	amestec de izomeri ai: mono-(2-tetradecil) naftalenelor; di-(2-tetradecil) naftalenelor; tri-(2-tetradecil) naftalenelor		410-190-0	132983-41-6	Xi; R36 R53	Xi R: 36-53 S: (2-)26-61		
602-085-00-5	2-bromopropan	E	200-855-1	75-26-3	F; R11 Repr. Cat. 1; R60 Xn; R48/20 R66	F; T R: 60-11-48/20-66 S: 16-53-45		
602-086-00-0	trifluoroiodometan iodură de trifluorometil		219-014-5	2314-97-8	Muta. Cat. 3; R68	Xn R: 68 S: (2-)36/37		
602-087-00-6	1,2,4-triclorobenzen		204-428-0	120-82-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)23-37/39-60-61		
602-088-00-1	2,3-dibromopropan-1-ol 2,3-dibromo-1-propanol	E	202-480-9	96-13-9	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 3; R62 T; R24 Xn; R20/22 R52-53	T R: 45-20/22-24-52/53-62 S: 53-45-61		
602-089-00-7	4-bromo-2-clorofluorobenzen		405-580-2	60811-21-4	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)26-36/37-60-61		
602-090-00-2	1-alil-3-cloro-4-fluorobenzen		406-630-6	121626-73-1	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)23-37-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
602-091-00-8	1,3-dicloro-4-fluorobenzen		406-160-1	1435-48-9	Xn; R22-48/20/22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-48/20/22-51/53 S: (2-)36/37-61		
602-092-00-3	1-bromo-3,4,5-trifluorobenzen		418-480-9	138526-69-9	R10 Carc. Cat. 3; R40 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 10-38-40-41-51/53 S: (2-)23-26-36/37/39-61		
603-104-00-X	fenarimol (ISO) alcool 2,4′-dicloro-α-(pirimidin-5-il)benzhidrilic		262-095-7	60168-88-9	Repr. Cat. 3; R62-63 R64 N; R51-53	Xn; N R: 51/53-62-63-64 S: (2-)36/37-61		
603-105-00-5	furan	E	203-727-3	110-00-9	F+; R12 R19 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22-48/22 Xi; R38 R52-53	F+; T R: 45-12-19-20/22-38-48/22-52/53 S: 53-45-61		
603-139-00-0	bis(2-metoxietil) eter		203-924-4	111-96-6	R10 R19 Repr. Cat. 2; R60-61	T R: 60-61-10-19 S: 53-45		
603-140-00-6	2,2′-oxibisetanol dietilenglicol		203-872-2	111-46-6	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)46		
603-141-00-1	amestec de: dodeciloxi-1-metil-1-[oxi-poli-(2-hidroximetiletanoxi)]pentadecan; dodeciloxi-1-metil-1-[oxi-poli-(2-hidroximetiletanoxi)]heptadecan		413-780-6	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
603-142-00-7	2-(2-(2-hidroxietoxi)etil)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan		407-360-1	116230-20-7	Xn; R21/22-48/20 Xi; R38-41	Xn R: 21/22-38-41-48/20 S: (2-)26-36/37/39		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-143-00-2	*R*-2,3-epoxi-1-propanol	E	404-660-4	57044-25-4	E; R2 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 2; R60 T; R23 Xn; R21/22 C; R34	E; T R: 45-60-2- 21/22-23-34 S: 53-45		
603-144-00-8	amestec de: 2,6,9-trimetil-2,5,9-ciclododecatrien-1-ol; 6,9-dimetil-2-metilen-5,9-ciclododecadien-1-ol		413-530-6	111850-00-1	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
603-145-00-3	2-izopropil-2-(1-metil-butil)-1,3-dimetoxipropan		406-970-5	129228-11-1	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)36/37-61		
603-146-00-9	2-[(2-[2-(dimetilamino) etoxi]etil) metilamino]etanol		406-080-7	83016-70-0	Xn; R22 C; R34 R52-53	C R: 22-34-52/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
603-147-00-4	(-)-*trans*-4-(4′-fluorofenil)-3-hidroximetil-*N*-metilpiperidină		406-030-4	105812-81-5	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)22-24-26-37/39-61		
603-148-00-X	1,4-bis[(viniloxi)metil]ciclohexan		413-370-7	17351-75-6	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
603-149-00-5	amestec de diastereoizomeri ai 1-(1-hidroxietil)-4-(1-metiletil) ciclohexanului		407-640-3	63767-86-2	Xi; R36/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2-)26-37-61		
603-150-00-0	(+/-) *trans*-3,3-dimetil-5-(2,2,3-trimetil-ciclopent-3-en-1-il)-pent-4-en-2-ol		411-580-3	107898-54-4	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)24/25-37-60-61		
603-151-00-6	(+/-)-2-(2,4-diclorofenil)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il) propan-1-ol		413-570-4	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
603-152-00-1	2-(4-*terț*-butilfenil)etanol		410-020-5	5406-86-0	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-48/22-62-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-153-00-7	3-((2-nitro-4-trifluorometil)fenil) amino)propan-1,2-diol		410-010-0	104333-00-8	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
603-154-00-2	1-[(2-*terț*-butil)ciclohexil]-2-butanol		412-300-2	139504-68-0	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
603-155-00-8	produse de reacție ale 2-(4,6-bis(2,4-dimetilfenil)-1,3,5-triazin-2-il)-5-hidroxifenolului cu ((alcoxi C_{10-16}, bogat în C_{12-13})metil)oxiranul		410-560-1	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
603-156-00-3	2-(2,4-diclorofenil)-2-(2-propenil)oxiran		411-210-0	89544-48-9	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
603-157-00-9	6,9-bis(hexadeciloximetil)-4,7-dioxanonan-1,2,9-triol		411-450-6	143747-72-2	R53	R: 53 S: 61		
603-158-00-4	amestec de 4 diastereoizomeri ai 2,7-dimetil-10-(1-metiletil)-1-oxaspiro[4.5] deca-3,6-dienei		412-460-3	—	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
603-159-00-X	2-ciclododecilpropan-1-ol		411-410-8	118562-73-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
603-160-00-5	1,2-dietoxipropan		412-180-1	10221-57-5	F; R11 R19	F R: 11-19 S: (2-)9-16-24-33		
603-161-00-0	1,3-dietoxipropan		413-140-6	3459-83-4	R10	R: 10 S: (2-)9-24		
603-162-00-6	α[2-[[[(2-hidroxietil) metilamino]acetil]amino] propil]-ω-(nonilfenoxi)poli[oxo(metil-1,2-etandiil)]		413-420-8	144736-29-8	C; R34 R43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61		
603-163-00-1	2-fenil-1,3-propandiol		411-810-2	1570-95-2	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-164-00-7	2-butil-4-cloro-4,5-dihidro-5-hidroxi-metil-1-[2′-(2-trifenilmetil-1,2,3,4-2*H*-tetrazol-5-il)-1,1′-bifenil-4-metil]-1*H*-imidazol		412-420-5	133909-99-6	R53	R: 53 S: 61		
603-165-00-2	amestec de: 4-alil-2,6-bis(2,3-epoxipropil)fenol; 4-alil-6-[3-[6-[3-[6-[3-(4-alil-2,6-bis(2,3-epoxi-propil)fenoxi)-2-hidroxi-propil]-4-alil-2-(2,3-epoxipropil)fenoxi]-2-hidroxipropil]-2-(2,3-epoxipropil)fenol; 4-alil-6-[3-(4-alil-2,6-bis(2,3-epoxipropil)fenoxi)-2-hidroxipropil]-2-(2,3-epoxipropil)fenol; 4-alil-6-[3-[6-[3-(4-alil-2,6-bis(2,3-epoxipropil)fenoxi)-2-hidroxipropil]-4-alil-2-(2,3-epoxipropil)fenoxi]-2-hidroxipropi]-2-(2,3-epoxipropil)fenol		417-470-1	—	Muta. Cat. 3; R68 R43	Xn R: 43-68 S: (2-)36/37		
603-166-00-8	(*R*)-1-cloro-2,3-epoxipropan 424		-280-2	51594-55-9	R10 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 C; R34 R43	T R: 45-10-23/24/25-34-43 S: 53-45		
604-012-00-2	4-cloro-*o*-cresol 4-cloro-2-metilfenol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T; C; R23-35 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R20-34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R20-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38	
604-056-00-2	2-(2-hidroxi-3,5-dinitroanilino)etanol		412-520-9	99610-72-7	F; R11 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R22	F; Xn R: 11-22-62 S: (2-)22-33-36/37		
604-057-00-8	amestec de: izomeri ai 2-(2*H*-benzotriazol-2-il)-4-metil-(*n*)-dodecilfenolului; izomeri ai 2-(2*H*-benzotriazol-2-il)-4-metil-(*n*)-tetracosilfenolului; izomeri ai 2-(2*H*-benzotriazol-2-il)-4-metil-5,6-didodecilfenolului; n = 5 sau 6		401-680-5	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
604-058-00-3	1,2-bis(3-metilfenoxi)etan		402-730-9	54914-85-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
604-059-00-9	2-*n*-hexadecilhidrochinonă		406-400-5	—	Xn; R48/22 Xi; R38 R43 R53	Xn R: 38-43-48/22-53 S: (2-)22-36/37-61		
604-060-00-4	9,9-bis(4-hidroxifenil)fluoren		406-950-6	3236-71-3	Xi; R36-38 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-50/53 S: (2-)26-37-60-61		
604-061-00-X	amestec de: 2-cloro-5-*sec*-tetradecilhidrochinone unde *sec*-tetradecil = 1-metiltridecil; 1-etildodecil; 1-propilundecil; 1-butildecil; 1-hexiloctil; 1-pentilnonil		407-740-7	—	Xi; R38 R43 R52-53	Xi R: 38-43-52/53 S: (2-)24-37-61		
604-062-00-5	2,4-dimetil-6-(1-metilpentadecil)fenol		411-220-5	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
604-063-00-0	5,6-dihidroxiindol		412-130-9	3131-52-0	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
604-064-00-6	2-(4,6-difenil-1,3,5-triazin-2-il)5-((hexil)oxi)-fenol		411-380-6	147315-50-2	R53	R: 53 S: 61		
605-028-00-2	*β*-metil-3-(1-metiletil)benzenpropanal		412-050-4	125109-85-5	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
605-029-00-8	2-ciclohexilpropanal		412-270-0	2109-22-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
605-030-00-3	1-(*p*-metoxifenil) acetaldehidă oxim		411-510-1	3353-51-3	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
606-053-00-1	flurtamonă (ISO) (*RS*)-5-metilamino-2-fenil-4-(α,α,α-trifluoro-*m*-tolil)furan-3(2*H*)-onă		—	96525-23-4	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-054-00-7	isoxaflutol (ISO) 5-ciclopropil-1,2-oxazol-4-il α,α,α-trifluoro-2-mesil-*p*-tolil cetonă		—	141112-29-0	Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53	Xn; N R: 50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		
606-055-00-2	1-(2,3-dihidro-1,3,3,6-tetrametil-1-(1-metiletil)-1*H*-inden-5-il)etanonă		411-180-9	92836-10-7	Xn; R22-48/22 N; R51-53	Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2-)24-36-61		
606-056-00-8	4-cloro-3′,4′-dimetoxibenzofenonă		404-610-1	116412-83-0	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-057-00-3	4-propilciclohexanonă		406-810-4	40649-36-3	Xi; R38 R52-53	Xi R: 38-52/53 S: (2-)25-37-61		
606-058-00-9	4′-fluoro-2,2-dimetoxiacetofenonă		407-500-1	21983-80-2	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
606-059-00-4	2,4-difluoro-α-(1H-1,2,4-triazo-1-il)acetofenonă hidroclorură		412-390-3	86386-75-6	Xn; R22 Xi; R41 R43	Xn R: 22-41-43 S: (2-)22-26-36/37/39		
606-060-00-X	amestec de: *trans*-2,4-dimetil-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-naftalen-2-il)1,3-dioxolan; *cis*-2,4-dimetil-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetra-metilnaftalen-2-il)1,3-dioxolan		412-950-7	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-061-00-5	(3-clorofenil)-(4-metoxi-3-nitrofenil)metanonă		423-290-4	66938-41-8	Muta. Cat. 3; R68 N; R50-53	Xn; N R: 68-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
607-232-00-7	piridat (ISO) *S*-octil tiocarbonat de *O*-(6-cloro-3-fenilpiridazin-4-il)		259-686-7	55512-33-9	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-246-00-3	metacrilat de alil esterul 2-propenilic al acidului 2-metilpropenoic		202-473-0	96-05-9	R10 T; R23 Xn; R21/22 N; R50	T; N R: 10-21/22-23-50 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-304-00-8	butil-fluazifop (ISO) (*RS*)-2-[4-(5-trifluorometil-2-piridiloxi)fenoxi]propionat de butil		274-125-6	69806-50-4	Repr. Cat. 2; R61 N; R50-53	T; N R: 61-50/53 S: 53-45-60-61		
607-305-00-3	*P*-butil-fluazifop (ISO) (*R*)-2-[4-(5-trifluorometil-2-piridiloxi)fenoxi] propio-nat de butil		—	79241-46-6	Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53	Xn; N R: 50/53-63 S: (2-)29-36/37-46-60-61		
607-306-00-9	clozolinat (ISO) (*RS*)-3-(3,5-dicloro-fenil)-5-metil-2,4-dioxo-oxazoli-din-5-carboxilat de etil		282-714-4	84332-86-5	Carc. Cat. 3; R40 N; R51-53	Xn; N R: 40-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-307-00-4	vinclozolin (ISO) N-3,5-diclorofenil-5-metil-5-vinil-1,3-oxazolidin-2,4-dionă		256-599-6	50471-44-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 2; R60-61 R43 N; R51-53	T; N R: 60-61-40-43-51/53 S: 53-45-61		
607-308-00-X	esteri ai 2,4-D	A	—	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)26-29-36/37-46-60-61		
607-309-00-5	etil-carfentrazonă (ISO) (*RS*)-2-cloro-3-[2-cloro-4-fluoro-5-[4-difluorometil-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]fenil]propionat de etil		—	128639-02-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-310-00-0	metil-kresoxim (ISO) (E)-2-metoxiimino-[2-(*o*-toliloximetil)fenil]acetat de metil		—	143390-89-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-311-00-6	etil-benazolin 4-cloro-2-oxo-2*H*-benzotiazol-3-acetat de etil		246-591-0	25059-80-7	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-312-00-1	acid metoxiacetic	E	210-894-6	625-45-6	Repr. Cat. 2; R60-61 Xn; R22 C; R34	T R: 60-61-22-34 S: 53-45	C ≥ 25 %: T; R60-61-22-34 10 % ≤ C < 25 %: T; R60-61-34 5 % ≤ C < 10 %: T; R60-61-36/37/38 0,5 % ≤ C < 5 %: T; R60-61	
607-313-00-7	clorură de neodecanoil		254-875-0	40292-82-8	T+; R26 Xn; R22 C; R34	T+ R: 22-26-34 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45	C ≥ 25 %: T+; R22-26-34 10 % ≤ C < 25 %: T+; R26-34 7 % ≤ C < 10 %: T+; R26-36/37/38 5 % ≤ C < 7 %: T; R23-36/37/38 1 % ≤ C < 5 %: T; R23 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20	
607-314-00-2	etofumesate (ISO) metansulfonat de (+/-)-2-etoxi-2,3-dihidro-3,3-dimetilbenzofuran-5-il		247-525-3	26225-79-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-315-00-8	glifosat (ISO) *N*-(fosfonometil)glicină		213-997-4	1071-83-6	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
607-316-00-3	trimesium-glifosat (ISO) trimetilsulfoniu-glifosat-		—	81591-81-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)36/37-46-61		
607-317-00-9	bis(2-etilhexil)ftalat di-(2-etilhexil)ftalat DEHP		204-211-0	117-81-7	Repr. Cat. 2; R60-61	T R: 60-61 S: 53-45		
607-318-00-4	dibutilftalat DBP		201-557-4	84-74-2	Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 N; R50	T; N R: 61-50-62 S: 53-45-61		
607-319-00-X	deltametrin (ISO) (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilat de(S)-α-ciano-3-fenoxibenzil		258-256-6	52918-63-5	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)24-28-36/37/39-38-45-60-61		
607-320-00-5	bis[4-(eteniloxi)butil]1,3-benzendicarboxilat		413-930-0	130066-57-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-321-00-0	(*S*)-metil-2-cloropropionat		412-470-8	73246-45-4	R10 Xn; R48/22 Xi; R36	Xn R: 10-36-48/22 S: (2-)23-26-36		
607-322-00-6	acid 4-(4,4-dimetil-3-oxo-pirazolidin-1-il)-benzoic		413-120-7	107144-30-9	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)22-61		
607-323-00-1	acrilat de 2-(1-(2-hidroxi-3,5-di-*terț*-pentilfenil)etil)-4,6-di-*terț*-pentilfenil		413-850-6	123968-25-2	R53	R: 53 S: 61		
607-324-00-7	amestec de: acid *N*,*N*-di(alchil hidrogenat C14-C18)ftalamic; alchil dehidrogenat(C14-C18) amină		413-800-3	—	R53	R: 53 S: 61		
607-325-00-2	(*S*)-acid 2-cloropropionic		411-150-5	29617-66-1	Xn; R21/22 C; R35	C R: 21/22-35 S: (1/2-)23-26-28-36/37/39-45		
607-326-00-8	amestec de: izobutil hidrogen 2-(α-2,4,6-trimetilnon-2-enil)succinat; izobutil hidrogen2-(β-2,4,6-trimetilnon-2-enil)succinat		410-720-0	141847-13-4	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
607-327-00-3	2-(2-iodoetil)-1,3-propandiol diacetat		411-780-0	127047-77-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)36-61		
607-328-00-9	metil 4-bromometil-3-metoxibenzoat		410-310-1	70264-94-7	Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
607-329-00-4	amestec de: 2-(C_{12-18} -*n*-alchilamino-1,4-butandioat de sodiu; 2-octadecenilamino-1,4-butandioat de sodiu		411-250-9	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-26-37/39		
607-330-00-X	(*S*)-acid 2,3-dihidro-1*H*-indol-2carboxilic		410-860-2	79815-20-6	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R48/22 R43	Xn R: 43-48/22-62 S: (2-)22-25-26-36/37		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-331-00-5	amestec de: bis(2,2,6,6-tetrametil-1-octiloxipiperidin-4-il)-1,10-decandioat; 1,8-bis[(2,2,6,6-tetrametil-4-((2,2,6,6-tetrametil-1-octiloxipiperidin-4-il)-decan-1,10-diol)piperidin-1-il)oxi]octan		406-750-9	—	R53	R: 53 S: 23-61		
607-332-00-0	ciclopentil cloroformiat		411-460-0	50715-28-1	R10 T; R23 Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43	T R: 10-22-23-41-43-48/22 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
607-333-00-6	amestec de: *N*-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin.4-il)-*β*-alalinat de dodecil; *N*-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-*β*-alalinat de tetradecil		405-670-1	—	Xn; R22-48/22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
607-334-00-1	1-etil-6,7,8-trifluoro-1,4-dihidro-4-oxochinolină-3-carboxilat de etil		405-880-3	100501-62-0	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
607-335-00-7	(*R*)-2-(4-(3-cloro-5-trifluorometil-2-piridiloxi)fenoxi)propionat de metil		406-250-0	72619-32-0	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
607-336-00-2	acetat de 4-metil-8-metilentriciclo[3,3,1,1^{3,7}]dec-2-il		406-560-6	122760-85-4	Xi; R38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-337-00-8	2-benzotiazoliltiosuccinat de di-*terț*-(C_{12-14})-alchilamoniu		406-052-4	125078-60-6	R10 Xn; R22 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 10-22-38-41-51/53 S: (2-)26-37/39-61		
607-338-00-3	2-hidroxi-2-metilbut-3-enoat de 2-metilpropil		406-235-9	72531-53-4	Xi; R36/38	Xi R: 36/38 S: (2-)26-37		
607-339-00-9	clorură de 2,3,4,5-tetraclorobenzoil		406-760-3	42221-52-3	Xn; R22 C; R34 R43	C R: 22-34-43 S: (1/2-)26-36/37/39-45		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-340-00-4	acetat de 1,3-bis(4-benzoil-3-hidroxifenoxi)prop-2-il		406-990-4	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-341-00-X	(9*S*)-9-amino-9-deoxieritromicin		406-790-7	26116-56-3	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
607-342-00-5	veratrat de 4-clorobutil		410-950-1	69788-75-6	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-343-00-0	bis(2-carboxibenzoat) de 4,7-metanooctahidro-1*H*-inden-diildimetil		407-410-2	—	R53	R: 53 S: 61		
607-344-00-6	amestec de: acid 3-(N-(3-dimetilaminopropil)-(C_{4-8}) perfluoroalchilsulfonamido)propionic; propionat de N-(dimetil-3-(C_{4-8}) -perfluoroalchilsulfonnamido)propilamoniu; propionatul acidului 3-(N-(3-dimetilpropilamoniu-(C_{4-8}) perfluoroalchilsulfonnamido)propionic		407-810-7	—	Xn; R48/22	Xn R: 48/22 S: (2-)21-22-36/37		
607-345-00-1	2-(2,4-diclorofenoxi)-(*R*)-propionat de potasiu		413-580-9	113963-87-4	Xn; R22 Xi; R38-41 R43	Xn R: 22-38-41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-346-00-7	3-icosil-4-henicosiliden-2-oxetanonă		401-210-9	83708-14-9	R53	R: 53 S: 61		
607-347-00-2	(*R*)-2-(2,4-diclorofenoxi)propionat de sodiu		413-340-3	119299-10-4	Xn; R22 Xi; R38-41 R43	Xn R: 22-38-41-43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-348-00-8	bis((*R*)-2-(2,4-diclorofenoxi)propionat) de magneziu		413-360-2	—	Xn; R22 Xi; R38-41 R43	Xn R: 22-38-41-43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-349-00-3	hidrogen 2,2′-ditiobis-benzoat de mono(tetrapropilamoniu)		411-270-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-350-00-9	bis(4-1,2-bis(etoxicarbonil)etilamino)-3-metil-ciclohexil)metan		412-060-9	136210-32-7	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)36/37-61		
607-351-00-4	O-(4-amino-3,5-dicloro-6-fluoropiridin-2-iloxi)acetat de metil		407-550-4	69184-17-4	N; R51-53	N R: 51/53 S: 20/21-61		
607-352-00-X	anhidridă 4,4′-oxidiftalică		412-830-4	1823-59-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-353-00-5	amestec de: *exo*-triciclo[5.2.1.$0^{2,6}$]decan-*endo*-2-carboxilat de etil; *endo*-triciclo[5.2.1.$0^{2,6}$] decan- *exo*-2-carboxilat de etil		407-520-0	80657-64-3	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
607-354-00-0	2-ciclohexilpropionat de etil		412-280-5	2511-00-4	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-355-00-6	4-clorobenzoat de *p*-tolil		411-530-0	15024-10-9	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-356-00-1	*trans*-2,2,6-trimetilciclohexancarboxilat de etil		412-540-8	—	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
607-357-00-7	amestec de: *trans*-4-acetoxi-4-metil-2-propil-tetrahidro-2*H*-piran; cis-4-acetoxi-4-metil-2-propil-tetrahidro-2*H*-piran		412-450-9	131766-73-9	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-358-00-2	(1*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-(4-nitrofenilmetil)-1-dioxo-6-fenilacetamido-penam-3-carboxilat		412-670-5	54275-93-3	R42	Xn R: 42 S: (2-)22		
607-359-00-8	(1*S*,4*R*,5*R*,7*R*)-(4-nitrofenilmetil)3-metilen-1-oxo-7-fenilacetamidocefam-4-carboxilat		412-800-0	76109-32-5	R42	Xn R: 42 S: (2-)22		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-360-00-3	3-acetoacetilamino-4-metoxitolil-6-sulfonat de sodiu		411-680-7	133167-77-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-361-00-9	(*R*)-2-(4-hidroxifenoxi)propionat de metil		411-950-4	96562-58-2	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
607-362-00-4	amestec de: 2-(2-(bis(2-hidroxietil)amino)etoxicarbonilmetil) hexadec-4-enoat de (3-metoxi)propilamoniu/[tris-(2-hidroxi-etil)]amoniu; 2-(2-(bis(2-hidroxietil)amino)etoxicarbonilmetil) tetradec-4-enoat de (3-metoxi)propilamoniu/[tris-(2-hidroxietil)]-amoniu; 2-(3-metoxipropilcarbamoilmetil) hexadec-4-enoat de (3-metoxi)-propilamoniu/[tris-(2-hidroxietil)]amoniu; 2-(3-metoxipropilcarbamoilmetil)tetradec-4-enoat de (3-metoxi)propilamoniu/[tris-(2-hidroxietil)]amoniu;		413-500-2	—	Xi; R38-41 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-51/53 S: (2-)26-37/39-61		
607-363-00-X	metil-3-metoxiacrilat		412-900-4	5788-17-0	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-364-00-5	3-fenil-7-[4-(tetrahidrofurfuriloxi)fenil]-1,5-dioxa-s-indacen-2,6-dionă		413-330-9	134724-55-3	R53	R: 53 S: 61		
607-365-00-0	clorură, hidroclorură de 2-(2-amino-1,3-tiazol-4-il)-(Z)-2-metoxiiminoacetil		410-620-7	119154-86-8	Xn; R22 C; R34 R43	C R: 22-34-43 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45		
607-366-00-6	clorură de 3,5-dimetilbenzoil		413-010-9	6613-44-1	C; R34 R43	C R: 34-43 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
607-367-00-1	bis(*N*-carboximetil)-*N*-metil-glicinato-(2-)*N*,*O*,*O*,*N*-ferat(1-) de potasiu, monohidrat		411-640-9	153352-59-1	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)37		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-368-00-7	1-(*N*,*N*-dimetilcarbamoil)-3-*terț*-butil-5-carbetoximetiltio-1*H*-1,2,4-triazol		411-650-3	110895-43-7	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)37-38-45-60-61		
607-369-00-2	amestec de: acid *trans*-(2R)-5-acetoxi-1,3-oxatiolan-2-carboxilic; acid *cis*-(2R)-5-acetoxi-1,3-oxatiolan-2-carboxilic		411-660-8	147027-04-1	Xn; R22 Xi; R38-41 R43	Xn R: 22-38-41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
607-370-00-8	2-[[2-(acetiloxi)-3-(1,1-dimetil-etil)-5-metilfenil]metil]-6-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol		412-210-3	41620-33-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-371-00-3	3-etil 5-metil 4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-2-[2-(1,3-dihidro-1,3-dioxo-(2*H*)izoindol-2-il)-etoximetil]-6-metil-3,5-piridindicarboxilat		413-410-3	88150-62-3	R53	R: 53 S: 61		
607-372-00-9	bis fenol A di-(norbornencarboxilat) etoxilat		412-410-0	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-373-00-4	(+/-) (*R*)-2-[4-(6-clorochinoxalin-2-iloxi)feniloxi]propionat de tetrahidrofurfuril	E	414-200-4	119738-06-6	Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R22-48/22 N; R50-53	T; N R: 61-22-48/22-62-68-50/53 S: 53-45-60-61		
607-374-00-X	diclorură de 5-amino-2,4,6-triiodo-1,3-benzendicarbonil		417-220-1	37441-29-5	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-36/37-61		
607-375-00-5	amestec de: *cis*-4-hidroxi-3-(1,2,3,4-tetrahidro-3-(4-(4-trifluorometilbenziloxi) fenil)-1-naftil)cumarină; *trans*-4-hidroxi-3-(1,2,3,4-tetrahidro-3-(4-(4-trifluorometilbenziloxi)fenil-1-naftil)cumarină		421-960-0	90035-08-8	T+; R26/27/28 T; R48/23/24/25 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-48/23/24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-45-60-61		
607-376-00-0	2,4-dibromobutanoat de benzil		420-710-8	23085-60-1	Repr. Cat. 3; R62 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 38-43-62-50/53 S: (2-)23-36/37-41-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-377-00-6	*trans*-4-ciclohexil-L-prolină, monohidrat		419-160-1	90657-55-9	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R22 Xi; R38-41 R43	Xn R: 22-38-41-43-62 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-378-00-1	(Z)-α-metoxiimino-2-furilacetat		405-990-1	97148-39-5	F; R11	F R: 11 S: (2-)22-43		
608-026-00-X	3-ciano-3,5,5-trimetilciclohexanonă		411-490-4	7027-11-4	Xn; R22-48/22 R43 R52-53	Xn R: 22-43-48/22-52/53 S: (2-)36/37-61		
608-027-00-5	amestec de: 3-(4-etilfenil)-2,2-dimetilpropannitril; 3-(2-etilfenil)-2,2-dimetilpropannitril; 3-(3-etilfenil) -2,2-dimetilpropannitril		412-660-0	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
608-028-00-0	2-ciano-3-fenilamino)-acrilat de 4-(2-ciano-3-fenilamino)-acriloiloxi-metil-ciclohexil-metil		413-510-7	147374-67-2	Xn; R48/20/21 R43 N; R51-53	Xn; N R: 43-48/20/21-51/53 S: (2-)36/37-61		
608-029-00-6	1,2-dihidro-6-hidroxi-4-metil-1-[3-(1-metiletoxi) propil]-2-oxo-3-piridincarbonitril		411-990-2	68612-94-2	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
608-030-00-1	*N*-acetil-*N*-[5-ciano-3-(2-dibutilamino-4-feniltiazol-5-il-metilen)-4-metil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-piridin-1-il]benzamidă		412-340-0	147741-93-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
609-041-00-4	2,4-dinitrofenol		200-087-7	51-28-5	T; R23/24/25 R33 N; R50	T; N R: 23/24/25-33-50 S: (1/2-)28-37-45-61		
609-050-00-3	2,3-dinitrotoluen	E	210-013-5	602-01-7	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R50-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22-50/53-62 S: 53-45-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
609-051-00-9	3,4-dinitrotoluen	E	210-222-1	610-39-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22-51/53-62 S: 53-45-61		
609-052-00-4	3,5-dinitrotoluen	E	210-566-2	618-85-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53	T R: 45-23/24/25-48/22-52/53-62 S: 53-45-61		
609-054-00-5	2,3-dinitrofenol [1] 2,5-dinitrofenol [2] 2,6-dinitrofenol [3] 3,4-dinitrofenol [4] săruri de dinitrofenol [5]		200-628-7 [1] 206-348-1 [2] 209-357-9 [3] 209-415-3 [4] - [5]	66-56-8 [1] 329-71-5 [2] 573-56-8 [3] 577-71-9 [4] - [5]	T; R23/24/25 R33 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-37-45-61		
609-055-00-0	2,5-dinitrotoluen	E	210-581-4	619-15-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22-51/53-62 S: 53-45-61		
609-056-00-6	2,2-dibromo-2-nitroetanol		412-380-9	69094-18-4	E; R2 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R35 R43 N; R50-53	E; C; N R: 2-22-35-40-43-48/22-50/53 S: (1/2-)23-26-35-36/37/39-45-60-61	C ≥ 10 %: C; R22-35-40-43-48/22 5 % ≤ C < 10 %: C; R34-40-43 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R36/37/38-40-43	
609-057-00-1	3-cloro-2,4-difluoronitrobenzen		411-980-8	3847-58-3	Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-50/53 S: (1/2-)22-26-28-36/37/39-45-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
609-058-00-7	2-nitro-2-fenil-1,3-propandiol		410-360-4	5428-02-4	T; R39-48/25 Xn; R21/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	T; N R: 21/22-39-41-43-48/25-51/53 S: 53-45-61		
609-059-00-2	2-cloro-6-(etilamino)-4-nitrofenol		411-440-1	131657-78-8	Xn; R22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)22-24-37/39-61		
609-060-00-8	4-[(3-hidroxipropil)amino] -3-nitrofenol		406-305-9	92952-81-3	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
609-061-00-3	(*E*,*Z*)-4-clorofenil(ciclopropil)cetonă O-(4-nitrofenilmetil)oximă		406-100-4	94097-88-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-062-00-9	2-bromo-2-nitropropanol		407-030-7	24403-04-1	T; R24 Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 22-24-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
609-063-00-4	2-[(4-cloro-2-nitrofenil) amino]etanol		413-280-8	59320-13-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)22-61		
611-053-00-X	dihidroclorură de 2,2′-azo-bis[2-metilpropionamidă]		221-070-0	2997-92-4	Xn; R22 R43	Xn R: 22-43 S: (2-)24-37		
611-055-00-0	C.I.Disperse Yellow 3 N-[4-[(2-hidroxi-5-metilfenil)azo]fenil] acetamidă		220-600-8	2832-40-8	Carc. Cat. 3; R40 R43	Xn R: 40-43 S: (2-)22-36/37-46		
611-056-00-6	C.I. Solvent Yellow 14 1-fenilazo-2-naftol		212-668-2	842-07-9	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 R43 R53	Xn R: 40-43-53-68 S: (2-)22-36/37-46-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-057-00-1	6-hidroxi-1-(3-izopropoxipropil)-4-metil-2-oxo-5-[4-(fenilazo)fenilazo]-1,2-dihidro-3-piridincarbonitril		400-340-3	85136-74-9	Carc. Cat. 2; R45 R53	T R: 45-53 S: 53-45-61		
611-058-00-7	formiat de (6-(4-hidroxi-3-(2-metoxifenilazo)-2-sulfonato-7-naftilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis [(amino-1-metiletil)amoniu]		402-060-7	108225-03-2	Carc. Cat. 2; R45 Xi; R41 N; R51-53	T; N R: 45-41-51/53 S: 53-45-61		
611-059-00-2	2-(6-(4-cloro-6-(3-(N-metil-N-(4-cloro-6-(3,5-disulfonato-2-naftilazo)-1-hidroxi-6-naftilamino)-1,3,5-triazin-2-il)aminometil) fenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-3,5-disulfonato-1-hidroxi-2-naftilazo) naftalen-1,5-disulfonat de octasodiu		412-960-1	148878-21-1	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)22-24-26-37/39-61		
611-060-00-8	amestec de: 5-[8-[4-[4-[4-[7-(3,5-dicarboxilatofenil-azo)-8-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-1-ilamino]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-di-sulfonatonaftalen-2ilazo]-izoftalat de sodiu; 5-[8-[4-[4-[4-[7-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-1-ilamino]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-2ilazo]-izoftalat de amoniu; acid 5-[8-[4-[4-[4-[7-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-1-ilamino]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-2ilazo]-izoftalic		413-180-4	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)22-24-26-37/39-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-061-00-3	5-[5-[4-(5-cloro-2,6-di-fluoropirimidin-4-ilamino) benzamido]-2-sulfonatofenilazo]-1-etil-6-hidroxi-4-metil-2-oxo-3-piridilmetilsulfonat de disodiu		412-530-3	—	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-062-00-9	2-(8-(4-cloro-6-(3-((4-cloro-6-(3,6-disulfonato-2-(1,5-disulfonatonaftalen-2-ilazo)-1-hidroxinaftalen-8-ilamino)-1,3,5-triazin-2-il)aminometil)fenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-3,6-disulfonato-1-hidroxinaftalen-2-ilazo)naftalen-1,5-disulfonat de octasodiu		413-550-5	—	Xi; R38-41	Xi R: 38-41 S: (2-)22-26-37/39		
611-063-00-4	[4′(8-acetilamino-3,6-disulfonato-2-naftilazo)-4′′-(6-benzoilamino-3-sulfonato-2-naftilazo)-bifenil-1,3′,3′′,1′′′-tetraolato-O,O′,O′′,O′′′]cupru (II) de trisodiu		413-590-3	—	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
611-064-00-X	4-(3,4-diclorofenilazo)-2,6 -di-*sec* -butil-fenol		410-600-8	124719-26-2	Xn; R48/22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 38-48/22-50/53 S: (2-)23-25-36/37-60-61		
611-065-00-5	4-(4-nitrofenilazo)-2,6-di-*sec*-butilfenol		410-610-2	111850-24-9	Xn; R48/22 Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-43-48/22-50/53 S: (2-)23-26-36/37-60-61		
611-066-00-0	5-[4-cloro-6-(N-etilanilino)-1,3,5-triazin-2-ilami-no]-4-hidroxi-3-(1,5-disulfonatonaftalen-2-ilazo)-naftalen-2,7-disulfonat de tetrasodiu		411-540-5	130201-57-9	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)22-24-26-37/39-61		
611-067-00-6	amestec de: 7-anilino-4-hidro-xi-3-(2-metoxi-5-metil-4-(4-sulfonatofenilazo)fenilazo)naftalen-2-sulfonat de bis(tris(2-(2-hidroxi(1-metil)etoxi)etil) amoniu); 7-anilino-4-hidroxi-3-(2-metoxi-5-metil-4-(4-sulfonatofenil-azo) fenilazo)naftalen-2-sulfonat de bis(tris(2-(2-hidroxi (2-metil)etoxi)etil)amoniu)		406-910-8	—	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)26-36/39-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-068-00-1	4-amino-3,6-bis(5-[4-cloro-6-(hidroxietilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonatofenilazo)-5-hidroxinaftalen-2,7-disulfonat de tetrasodiu		400-690-7	85665-98-1	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-069-00-7	*N,N*-di-[poli(oxietilen)-copoli(oxipropilen)]-4-[(3,5-diciano-4-metil-2-tienil) azo)]-3-metilanilină		413-380-1	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-070-00-2	amestec de: (6-(4-anisidino)-3-sulfonato-2-(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-1-naftolato)(1-(5-cloro-2-oxidofenilazo)-2-naftolato) cromat(-) de disodiu; bis (5-(4-anisidino)-3-sulfonato-2-(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-1-naftolato) cromat(1-) de trisodiu		405-665-4	—	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
611-071-00-8	5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonatofenilazo)pirazol-3-carboxilat de tris(tetrametilamoniu)		406-073-9	131013-81-5	T; R25 R52-53	T R: 25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
611-072-00-3	2,4-bis[2,2′[*N,N*-dimetilamino)etiloxicarbonil]fenilazo]-1,3-dihidroxibenzen, dihidroclorură		407-010-8	118208-02-9	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-073-00-9	3,3′-(N-(4-(4-bromo-2,6-dicianofenilazo)-3-hidroxifenil) imino)dipropionat de dimetil		407-310-9	122630-55-1	R53	R: 53 S: 61		
611-074-00-4	amestec de: (3-(4-(5-(5-cloro-2,6-difluoropirimidin-4-ilamino)-2-metoxi-3-sulfonatofenilazo)-2-oxidofenilazo)-2,5,7-trisulfonato-4-naftolato)cupru(II) de sodiu/potasiu; (3-(4-(5-(5-cloro-4,6-difluoropirimidin-2-ilamino)-2-metoxi-3-sulfonatofenilazo)-2-oxidofenilazo)-2,5,7-trisulfonato-4-naftolato)cupru (II) de sodiu/potasiu		407-100-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-075-00-X	amestec 2:1 de: 4-amino-3-(4-(4-(2-amino-4-hidroxifenilazo)anilino)-3-sulfonatofenilazo)-5,6-dihidro-5-oxo-6-fenilhidrazononaftalen-2,7-disulfonat de tris(3,5,5-trimetilhexilamoniu); 4-amino-3-(4-(4-(4-amino-2-hidroxifenilazo)anilino)-3-sulfonatofenilazo)-5,6-dihidro-5-oxo-6-fenilhidrazononaftalen-2,7-disulfonat de tris(3,5,5-trimetilhexilamoniu)		406-000-0	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-076-00-5	3-(2,6-dicloro-4-nitrofenilazo)-1-metil-2-fenilindol		406-280-4	117584-16-4	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-077-00-0	(5,5′-diamino-(μ-4,4′-dihidroxi-1:2-κ-2,O4,O4′,-3,3′-[3,3′-dihidroxi-1:2-κ-2-O3,O3′-bifenil-4,4′-ilen-bisazo-1:2-(N3,N4-η:N3′,N4′-η)]-dinaftalen-2,7-disulfonato(8)))dicuprat(2-) de dilitiu și disodiu		407-230-4	126637-70-5	Xn; R22 R43	Xn R: 22-43 S: (2-)22-24-37		
611-078-00-6	(2,2′-(3,3′-dioxidobifenil-4,4′-diildiazo)bis(6-(4-(3-(dietilamino)propilamino)-6-(3-(dietilamonio)propilamonio)-1,3,5-triazin-2-il-amino)-3-sulfonato-1-naftolato))dicupru(II) acetat lactat		407-240-9	159604-94-1	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
611-079-00-1	7-[4-cloro-6-(N-etil-o-toluidino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(4-metoxi-2-sulfonatofenilazo)-2-naftalensulfonat de disodiu		410-390-8	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
611-080-00-7	3-(2-acetamido-4-(4-(2-hidroxibutoxi)fenilazo)fenilazo) benzensulfonat de sodiu		410-150-2	147703-65-9	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-081-00-2	[7-(2,5-dihidroxi-KO2-7-sulfonato-6-[4-(2,5,6-tricloropirimidin-4-ilamino) fenilazo]-(N1,N7-N)-1-naftilazo)-8-hidroxi-KO8-naftalen-1,3,5-trisulfonato (6-)]cuprat(II)de tetrasodiu		411-470-5	141048-13-7	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-082-00-8	amestec de: bis(1-(3(sau 5)-(4-anilono-3-sulfonatofenilazo)-4-hidroxi-2-oxidofenilazo)-6-nitro-4-sulfonato-2-naftolato)ferat(1-) de pentasodiu; [(1-(3-(4-anilono-3-sulfonatofenilazo)-4-hidroxi-2-oxidofenilazo)-6-nitro-4-sulfonato-2-naftolato)-(5-(4-anilino-3-sulfonatofenilazo)-4-hidroxi-2-oxidofenilazo) -6-nitro-4-sulfonato-2-naftolato]ferat(1-)de pentasodiu		407-570-3	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-083-00-3	amestec (1:1) de: acetat de 2-[*N*-etil-4-[(5,6-diclorobenzotiazol-2-il)azo]-*m*-toluidino]etil; acetat de 2-[*N*-etil-4-[(6,7-diclorobenzotiazol-2-il)azo]-*m*-toluidino]etil		411-560-4	—	T; R48/25 R43 N; R51/53	T; N R: 43-48/25-51/53 S: (1/2-)22-36/37-R45-61		
611-084-00-9	amestec de: *N*-(4-clorofenil)-4-(2,5-dicloro-4-(dimetilsulfamoil) fenilazo)-3-hidroxi-2-naftalencarboxamidă; *N*-(4-clorofenil)-4-(2,5-dicloro-4-(metilsulfamoil)fenilazo)-3-hidroxi-2-naftalencarboxamidă		412-550-2	—	R53	R: 53 S: 61		
611-085-00-4	amestec de: 3-ciano-5-(2-ciano-4-nitrofenilazo)-2-(2-hidroxietilamino)-4-metil-6-[3-(2-fenoxietoxi) propilamino]piridină; 3-ciano-5-(2-ciano-4-nitrofenilazo)-6-(2-hidroxietilamino)-4-metil- 2-[3-(2-fenoxietoxi)propilamino]piridină; 3-ciano-5-(2-ciano-4-nitrofenilazo)-2-amino- 4-metil-6-[3-(3-hidroxipropoxi)propilamino]piridină; 3-ciano-5-(2-ciano-4-nitrofenilazo)-6-amino- 4-metil-2-[3-(3-metoxipropoxi)propilamino]piridină		411-880-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
611-086-00-X	5-[[2,4-dihidroxi-5-[(2-hidroxi-3,5-dinitrofenil) azo]fenil]azo]-2-naftalensulfonat] de monolitiu, complexul cu fier, monohidrat		411-360-7	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-087-00-5	amestec de: 3-((5-ciano-1,6-dihidro-1,4-dimetil-2-hidroxi-6-oxo-3-piridinil)azo)-benzoiloxi-2-fenoxietan; 3-((5-ciano-1,6-dihidro-1,4-dimetil-2-hidroxi-6-oxo-3-piridinil)azo)-benzoiloxi-2-etiloxi-2-(etilfenol)		411-710-9	—	R53	R: 53 S: 61		
611-088-00-0	amestec de: 4-amino-3-((4-((4-((2-amino-4-hidroxifenil)azo)fenil)amino)-3-sulfofenil)azo)-5-hidroxi-6-(fenilazo)naftalen-2,7-disulfonat de trilitiu; 4-amino-3-((4-((4-((4-amino -2-hidroxifenil)azo)fenil)amino)-3-sulfofenil)azo)-5-hidroxi-6-(fenilazo)naftalen-2,7-disulfonat de trilitiu		411-890-9	—	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
611-089-00-6	metilsulfat de 2-((4-(etil-(hidroxietil)amino)-2-metilfenil)azo-6-metoxi-3-metilbenzotiazoliu		411-100-2	136213-73-5	Xn; R48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 43-48/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
611-090-00-1	4-metilbenzensulfonat de 2,5-dibutoxi-4-(morfolin-4-il)benzendiazoniu		413-290-2	93672-52-7	F; R11 Xn; R22 Xi; R41 R43 R52-53	F; Xn R: 11-22-41-43-52/53 S: (2-)12-22-24-26-37/39-47-61		
611-091-00-7	5-((5-((5-cloro-6-fluoro-pirimidin-4-il)amino)-2-sulfonatofenil)azo)-1,2-dihidro-6-hidroxi-1,4-dimetil-2-oxo-3-piridinmetilsulfonat de sodiu (1,0-1,95) /litiu (0,05-1)		413-470-0	134595-59-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24/25-37		
611-092-00-2	bis(3-(4-((5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil)azo)-3-metil-5-hidroxi-(1*H*)pirazol-1-il)-benzensulfonamidato)cromat de *terț*-(dodecil/tetradecil)-amoniu		413-210-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-093-00-8	2-(4-(4-fluoro-6-(2-sulfoetilamino)-[1,3,5]triazin-2-ilamino)-2-ureidofenil-azo)-5-(4-sulfofenilazo) benzen-1-sulfonat de sodiu		410-770-3	146177-84-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-094-00-3	amestec (50:50) de: 2-[2-acetamino-4-[*N*,*N*-bis[2-etoxicarboniloxi) etil]amino]fenilazo]-5,6-dicloro-1,3-benzotiazol; 2-[2-acetamino-4-[*N*,*N*-bis [2-etoxicarboniloxi)etil] amino]fenilazo]-6,7-dicloro-1,3-benzotiazol		411-600-0	143145-93-1	R53	R: 53 S: 61		
611-095-00-9	dihidroxid de hexasodiu și 1,1′-[(1-amino-8-hidroxi -3,6-disulfonat-2,7-naftalendiil)bis(azo(4-sulfonat-1,3-fenil)imino[6-[(4-cloro-3-sulfonatofenil)amino]-1,3,5-triazin-2,4-diil]]]bis[3-carboxipiridiniu]		412-240-7	89797-03-5	N; R51-53	N R: 51/53 S: 22-61		
611-096-00-4	*N*-[3-acetilamino)-4-(2-ciano-4-nitrofenilazo) fenil]-*N*-[(1-metoxi)acetil] glicinat de metil		413-040-2	149850-30-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-097-00-X	amestec de izomeri ai complecșilor fierului (1:2) dintr-un amestec de: izomeri de: 1,3-dihidroxi-4-[(5-fenilaminosulfonil)-2-hidroxifenilazo]-*n*-(5-aminosulfonil-2-hidroxifenilazo)benzen (*n* = 2,5,6); izomeri de: 1,3-dihidroxi-4-[(5-fenilaminosulfonil)-2-hidroxifenilazo]-*n*-[4-(4-nitro-2-sulfofenilamino)fenilazo] benzen (*n* = 2,5,6)		414-150-3	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
611-098-00-5	tetrakis(tetrametilamoniu) 3,3′-(6-(2-hidroxietilamino)1,3,5-triazin-2,4-diilbis-imino(2-metil-4,1-fenilenazo))bis-naftalen-1,5-disulfonat		405-950-3	131013-83-7	T; R25 R52-53	T R: 25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
612-160-00-4	*p*-toluidină [1] 4-aminotoluen [1] clorură de toluidiniu [2] sulfat de toluidină (1:1) [3]		203-403-1 [1] 208-740-8 [2] 208-741-3 [3]	106-49-0 [1] 540-23-8 [2] 540-25-0 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T; R23/24/25 Xi; R36 R43 N; R50	T; N R: 23/24/25-36-40-43-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
612-161-00-X	2,6-xilidină 2,6-dimetilanilină		201-758-7	87-62-7	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/21/22 Xi; R37/38 N; R51-53	Xn; N R: 20/21/22-37/38-40-51/53 S: (2-)23-25-36/37-61		
612-162-00-5	clorură de dimetildioctadecilamoniu DODMAC		203-508-2	107-64-2	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)24-26-39-46-60-61		
612-163-00-0	metalaxil-M)ISO) mefenoxam ester metilic al acidului (*R*)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propionic		—	70630-17-0	Xn; R22 Xi; R41	Xn R: 22-41 S: (2-)26-39-46		
612-164-00-6	2-butil-2-etil-1,5-diaminopentan		412-700-7	137605-95-9	Xn; R21/22-48/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-48/22-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
612-165-00-1	*N*,*N*′-difenil-*N*,*N*′-bis(3-metilfenil)-(1,1′-difenil)-4,4′-diamină		413-810-8	65181-78-4	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
612-166-00-7	amestec de: fosfat de *cis*-(5-amoniu-1,3,3-trimetil)-ciclohexanmetilamoniu (1:1); fosfat de *trans*-(5-amoniu-1,3,3-trimetil)-ciclohexanmetilamoniu (1:1)		411-830-1	114765-88-7	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
612-167-00-2	5-acetil-3-amino-10,11-dihidro-5*H*-dibenz[*b*,*f*] azepin-hidroclorură		410-490-1	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
612-168-00-8	3,5-dicloro-2,6-difluoropiridin-4-amină		220-630-1	2840-00-8	Xn; R21/22 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-51/53 S: (2-)36/37-61		
612-170-00-9	4-clorofenil ciclopropil cetonă *O*-(4-aminobenzil)oximă		405-260-2	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
612-171-00-4	*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraglicidil-4,4′-diamino-3,3′-dietildifenilmetan		410-060-3	130728-76-6	Muta. Cat. 3; R68 R43 N; R51-53	Xn; N R: 43-68-51/53 S: (2-)36/37-61		
612-172-00-X	4,4′-metilenbis(N,N′-dimetilciclohexanamină)		412-840-9	13474-64-1	Xn; R22-48/22 C; R35 R52-53	C R: 22-35-48/22-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
612-173-00-5	1-amino-4-(4-*terț*-butilanilino)antrachinon-2-sulfonat		411-140-0	125328-86-1	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
612-174-00-0	4,4-dimetoxibutilamină		407-690-6	19060-15-2	Xn; R22 C; R34 R43 R52-53	C R: 22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
612-175-00-6	2-(O-aminooxi)etilamină dihidroclorură		412-310-7	37866-45-8	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
612-176-00-1	polimer de 1,3-dibromopropan și *N*,*N*-dietil-*N*′,*N*′-dimetil-1,3-propandiamină		410-570-6	143747-73-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
612-177-00-7	2-naftilamino-6-sulfometilamidă		412-120-4	—	Xn; R48/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 43-48/22-51/53 S: (2-)22-36/37-61		
612-178-00-2	1,4,7,10-tetraazaciclododecan disulfat		412-080-8	112193-77-8	Xn; R22 Xi; R37-41 R52-53	Xn R: 22-37-41-52/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
612-179-00-8	clorură de 1-(2-propenil) piridiniu		412-740-5	25965-81-5	Xn; R22 R43	Xn R: 22-43 S: (2-)24-37		
612-180-00-3	3-aminobenzilamină		412-230-2	4403-70-7	Xn; R22 C; R34 N; R51-53	C; N R: 22-34-51/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61		
612-181-00-9	2-feniltioanilină		413-030-8	1134-94-7	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
612-182-00-4	bromură de 1-etil-1-metilmorfoliniu		418-210-1	65756-41-4	Muta. Cat. 3; R68	Xn R: 68 S: (2-)36/37		
612-183-00-X	bromură de 1-etil-1-metilpirolidiniu		418-200-5	69227-51-6	Muta. Cat. 3; R68	Xn R: 68 S: (2-)36/37		
613-054-00-0	tiabenzol (ISO) 2-(tiazol-4-il)benzimidazol		205-725-8	148-79-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-163-00-3	azimsulfuron (ISO) 1-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-3[1-metil-4-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)pirazol-5-ilsulfonil]uree		—	120162-55-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-164-00-9	flufenacet (ISO) *N*-(4-fluorofenil)-*N*-izopropil-2-(5-trifluorometil[1,3,4]tiadiazol-2-iloxi) acetamidă		—	142459-58-3	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)13-24-37-60-61		
613-165-00-4	flupirsulfuron-metil-sodiu (ISO) 2-[[(4,6-dimetoxipirimidin -2-ilcarbamoil)sulfamoil]-6-trifluorometil]nicotinat de metil, sarea monosodică		—	144740-54-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-166-00-X	flumioxazin (ISO) *N*-(7-fluoro-3,4-dihidro-3-oxo-4-prop-2-inil-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)ciclohex-1-en-1,2-dicarboxamidă		—	103361-09-7	Repr. Cat. 2; R61 N; R50-53	T; N R: 61-50/53 S: 53-45-60-61		
613-167-00-5	amestec de: 5-cloro-2-metil-2*H*-izotiazol-3-onă [CE nr. 247-500-7] și 2-metil-2*H*-izotiazol-3-onă [CE nr. 220-239-6] (3:1) amestec de: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [CE nr. 247-500-7] și 2-metil-4-izotiazolin-3-onă [CE nr.220-239-6] (3:1)		—	55965-84-9	T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-34-43-50/53 S: (2-)26-28-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T; R23/24/25-34-43 3 % ≤ C < 25 %: C; R20/21/22-34-43 0,6 % ≤ C < 3 %: C; R34-43 0,06 % ≤ C < 0.6 %: Xi; R36/38-43 0,0015 % ≤ C < 0.06 %: Xi; R43	

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
613-168-00-0	1-vinil-2-pirolidonă	D	201-800-4	88-12-0	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/21/22-48/20 Xi; R37-41	Xn R: 20/21/22-37-40-41-48/20 S: 26-36/37/39		
613-169-00-6	9-vinilcarbazol		216-055-0	1484-13-5	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R21/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-43-50/53-68 S: 22-23-36/37-60-61		
613-170-00-1	2,2-etilmetiltiazolidină		404-500-3	694-64-4	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-171-00-7	(*RS*)-2-(2,4-diclorofenil)-1-(1*H*-1,2,4-triazil-1-il) hexan-2-ol		413-050-7	79983-71-4	Xn; R22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-172-00-2	5-cloro-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-onă		412-200-9	17630-75-0	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R22 R43 R52-53	Xn R: 22-43-62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
613-173-00-8	3-(2,4-diclorofenil)-6-fluoro-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)chinazolin-4-(3*H*)-onă		411-960-9	136426-54-5	T; R23/25-48/25 Xn; R21 Xi; R38 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-38-48/25-50/53 S: (1/2-)36/37/39-38-45-60-61		
613-174-00-3	(+/-) 2-(2,4-diclorofenil)-3-(1H-1,2,4-triazol-1- propil-1,1,2,2-tetrafluoro-etileter		407-760-7	112281-77-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/22 N; R51-53	Xn; N R: 20/22-40-51/53 S: (2-)36/37-41-61		
613-175-00-9	(2*RS*,3*RS*)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluorofenil)-[(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil]oxiran		406-850-2	106325-08-0	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 N; R51-53	T; N R: 61-40-62-51/53 S: 53-45-61		
613-176-00-4	2-metil-2-azabiciclo[2.2.1] heptan		404-810-9	4254-95-2	R10 Xn; R21/22-48/20 C; R34	C R: 10-21/22-34-48/20 S: (1/2-)16-26-36/37/39-45		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
613-177-00-X	8-amino-7-metilchinolină		412-760-4	5470-82-6	Xn; R21/22 R43 N; R51/53	Xn; N R: 21/22-43-51/53 S: (2-)36/37-61		
613-178-00-5	4-etil-2-metil-2-izopentil-1,3-oxazolidin		410-470-2	137796-06-6	C; R34 R43	C R: 34-43 S: (1/2-)7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 5 %: R43	
613-179-00-0	litiu 3-oxo-1,2(2*H*)-benzizotiazol-2-idă		411-690-1	111337-53-2	Xn; R22 C; R34 R43 N; R51-53	C; N R: 22-34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
613-180-00-6	*N*-(1,1-dimetiletil)bis(2-benzotiazolsulfen) amidă		407-430-1	3741-80-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
615-024-00-2	2-feniletilizocianat		413-080-0	1943-82-4	T; R23 Xn; R22 C; R35 R42/43 N; R51-53	T; C; N R: 22-23-35-42/43-51/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-43-45-61		
615-025-00-8	dicianat de 4,4′-etilidendifenil		405-740-1	47073-92-7	Xn; R20/22-48/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-48/22-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
615-026-00-3	4,4′-metilenbis(2,6-dimetilfenilcianat)		405-790-4	101657-77-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
615-028-00-4	etil 2-(izocianatosulfonil) benzoat		410-220-2	77375-79-2	E; R2 R14 Xn; R22-48/22 Xi; R41 R42/43	E; Xn R: 2-14-22-41-42/43-48/22 S: (2-)8-23-26-30-35-36/37/39		
615-029-00-X	2,5-bis-izocianatometil-biciclo[2.2.1]heptan		411-280-2	—	T+; R26 Xn; R22 C; R34 R42/43 R52-53	T+ R: 22-26-34-42/43-52/53 S: (1/2-)23-26-28-36/37/39-45-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
616-052-00-8	formamidă		200-842-0	75-12-7	Repr. Cat. 2; R61	T R: 61 S: 53-45		
616-053-00-3	*N*-metilacetamidă		201-182-6	79-16-3	Repr. Cat. 2; R61	T R: 61 S: 53-45		
616-054-00-9	iprodionă (ISO) 3-(3,5-diclorofenil)-2,4-dioxo-*N*-izopropilimidazolidin-1carboxamidă		253-178-9	36734-19-7	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
616-055-00-4	propizamidă (ISO) 3,5-dicloro-N-(1,1-dimetilprop-2-inil)benzamidă		245-951-4	23950-58-5	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
616-056-00-X	*N*-metilformamidă	E	204-624-6	123-39-7	Repr. Cat. 2; R61 Xn; R21	T R: 61-21 S: 53-45		
616-057-00-5	amestec de: *N*-[3-hidroxi-2-(2-metilacriloilaminometoxi)propoximetil]-2-metilacrilamidă; *N*-[2,3-bis-(2-metilacriloilaminometoxi)propoximetil]-2-metilacrilamidă; metacrilamidă; 2-metil-*N*-(2-metilacriloilaminometoximetil)acrilamidă; *N*-(2,3-dihidroxipropoxi-metil)-2-metilacrilamidă		412-790-8	—	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R48/22	T R: 45-48/22 S: 53-45		
616-058-00-0	1,3-bis(3-metil-2,3-dioxo-1*H*-pirolinilmetil)benzen		412-570-1	119462-56-5	Xn; R48/22 Xi; R41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 41-43-48/22-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
616-059-00-6	4-((-(dietilamino)-2-etoxifenil)imino-1,4-dihidro-1-oxo-*N*-propil-2-naftalencarboxamidă		412-650-6	121487-83-0	R53	R: 53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
616-060-00-1	produs de condensare al: acidului 3-(7-carboxihept-1-il)-6-hexil-4-ciclohexen-1,2-dicarboxilic cu poliaminele (în special cu aminoetilpiperazina și trietilentetramina)		413-770-1	—	Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
616-061-00-7	*N*,*N*′-1,6-hexandiilbis(*N*-(2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il)formamidă		413-610-0	124172-53-8	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2-)26-61		
616-062-00-2	*N*-[3-[(2-acetiloxi)etil] (fenilmetil)amino]-4-metoxifenilacetamidă		411-590-8	70693-57-1	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
616-063-00-8	3-dodecil-(1,2,2,6,6-pentametil-4-piperidin)-il)-2,5-pirolidindionă		411-920-0	106917-30-0	T; R23 Xn; R22-48/22 C; R35 N; R50-53	T; C; N R: 22-23-35-48/22-50/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-60-61		
616-064-00-3	*N*-*terț*-butil-3-metilpicolinamidă		406-720-5	32998-95-1	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-065-00-9	3′-(3-acetil-4-hidroxifenil)-1,1-dietiluree		411-970-3	79881-89-3	Xn; R22-48/22	Xn R: 22-48/22 S: (2-)22-36		
616-066-00-4	5,6,12,13-tetracloroantra (2,1,9-*def*:6,5,10-*d*′*e*′*f*′)diizochinolin-1,3,8,10 (2*H*,9*H*)-tetronă		405-100-1	115662-06-1	Repr. Cat. 3; R62	Xn R: 62 S: (2-)22-36/37		
616-067-00-X	3-(2-(3-benzil-4-etoxi-2,5-dioxoimidazolidin-1-il)-4,4-dimetil-3-oxovaleramido)-4-clorobenzoat de dodecil		407-300-4	92683-20-0	R53	R: 53 S: 61		
616-068-00-5	4-(11-metacrilamidoundecanamido)benzensulfonat de potasiu		406-500-9	174393-75-0	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
616-069-00-0	1-hidroxi-5-(2-metilpropiloxicarbonilamino)-*N*-(3-dodeciloxipropil)-2-naftoamidă		406-210-2	110560-22-0	R53	R: 53 S: 61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
616-070-00-6	amestec de: 3,3′-diciclo-hexil-1,1′-metilenbis(4,1-fenilen)diuree; 3-ciclohexil-1-(4-(4-(3-octadecilureido)benzil)fenil)uree; 3,3′-dioctadecil-1,1′-metilenbis(4,1-fenilen)diuree		406-530-2	—	R53	R: 53 S: 22-61		
616-071-00-1	amestec (1:2:1) de:bis(*N*-ciclohexil-*N*′-fenilenureido)metilen; bis(*N*-octadecil -*N*′-fenilenureido)metilen bis(*N*-diciclohexil-*N*′-fenilenureido)metilen		406-550-1	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
616-072-00-7	1-(2-deoxi-5-*O*-tritil-*β*-D-treopentofuranosil)timină		407-120-6	55612-11-8	R53	R: 53 S: 61		
616-073-00-2	4′-etoxi-2-benzimidazolanilidă		407-600-5	120187-29-3	Muta. Cat. 3; R68 R53	Xn R: 68-53 S: (2-)22-36/37-61		
616-074-00-8	*N*-butil-2-(4-morfolinilcarbonil)benzamidă		407-730-2	104958-67-0	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)24-26-37-61		
616-075-00-3	D,L-(*N*,*N*-dietil-2-hidroxi-2-fenilacetamidă)		408-120-9	65197-96-8	Xn; R22 Xi; R41	Xn R: 22-41 S: (2-)26-39-(46-)		
616-076-00-9	*N*-*terț*-butil-*N*′-(4-etilbenzoil)-3,5-dimetilbenzohidrazidă		412-850-3	112410-23-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-077-00-4	amestec de: acid 2-(9-metil-1,3,8,10-tetraoxo-2,3,9,10-tetrahidro-(1*H*, 8*H*)-antra[2,1,9-*def*: 6,5,10 -*d*′*e*′*f*′]diizochinolin-2-il-etansulfonic; 2-(9-metil-1,3,8,10-tetraoxo-2,3,9,10-tetrahidro-(1*H*,8*H*)-antra [2,1,9-*def*: 6,5,10-*d*′*e*′*f*′]di-izochinolin-2-iletansulfat de potasiu		411-310-4	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
616-078-00-X	2-[2,4-bis(1,1-dimetil-etil) fenoxi]-*N*-(2-hidroxi-5-metilfenil)hexanamidă		411-330-3	104541-33-5	R53	R: 53 S: 61		
616-079-00-5	1,6-hexandiil-bis(2-(2-(1-etilpentil)-3-oxazolidinil)etil)carbamat		411-700-4	140921-24-0	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-080-00-0	4-(2-((3-etil-4-metil-2-oxopirolin-1-il) carboxa-mido)etil)benzensulfonamidă		411-850-0	119018-29-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-081-00-6	5 -bromo-8-naftolactamă		413-480-5	24856-00-6	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)22-24-37-60-61		
616-082-00-1	*N*-(5-cloro-3-((4-(dietilamino)-2-metilfenil)imino-4-metil-6-oxo-1,4-ciclohexadien-1-il)benzamidă		413-200-1	129604-78-0	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-083-00-7	[2-[(4-nitrofenil)amino] etil]uree		410-700-1	27080-42-8	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
616-084-00-2	2,4-bis[*N′*-(4-metilfenil) ureido]toluen		411-790-5	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-085-00-8	3-(2,4-diclorofenil)-6-fluorochinazolin-2,4-(1*H*,3*H*)-dionă		412-190-6	168900-02-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-086-00-3	2-acetilamino-6-cloro-4-[(4-dietilamino)-2-metilfenilimino]-5-metil-1-oxo-2,5-ciclohexadienă		412-250-1	102387-48-4	R53	R: 53 S: 61		
616-087-00-9	amestec de: 7,9,9-trimetil-3,14-dioxa-4,13-dioxo-5,12-diazahexadecan-1,16-diil-prop-2-enoat; 7,7,9-trimetil-3,14-dioxa-4,13-dioxo-5,12-diazahexadecan-1,16-diilprop-2-enoat		412-260-6	52658-19-2	Xi; R36 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36-43-51/53 S: (2-)26-36/37-61		

Index nr.	Denumire chimică	Note referitoare la substante	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
616-088-00-4	2-aminosulfonil-N,N-metilnicotinamidă		413-440-7	112006-75-4	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
616-089-00-X	5-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin)-3-fluoro-2-hidroximetiltetrahidrofuran		415-360-8	41107-56-6	Muta. Cat. 3; R68	Xn R: 68 S: (2-)22-36/37		
616-090-00-5	1-(1,4-benzodioxan-2-il-carbonil)piperazin hidroclorură		415-660-9	70918-74-0	T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-48/22-51/53 S: 53-45-61		
616-091-00-0	1,3,5-tris-[(2*S* și 2*R*)-2,3-epoxipropil]-1,3,5-triazin-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trionă	E	423-400-0	59653-74-6	Muta. Cat. 2; R46 T; R23 Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43	T R: 46-22-23-41-43-48/22 S: 53-45		
617-016-00-4	2-etil-2-metilheptanperoxoat de 3-hidroxi-1,1-dimetilbutil		413-910-1	—	O; R7 R10 Xi; R38 N; R50-53	O; Xi; N R: 7-10-38-50/53 S: (2-)7/47-14-36/37/39-60-61		
617-017-00-X	amestec de: 2,2′-bis(*terț*-pentilperoxi)-*p*-diizopropilbenzen; 2,2′-bis(*terț*-pentilperoxi)-*m*-diizopropilbenzen		412-140-3	32144-25-5	O; R7 R53	O R: 7-53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		

ANEXA 1D

Nr. de index

601050-00-1	609-017-00-3	613-006-00-9

ANEXA 1E

Nr. de index

006-005-00-4	602-079-00-2	612-111-00-7
006-012-00-2	603-056-00-X	612-128-00-X
015-022-00-6	604-009-00-6	612-147-00-3
015-048-00-8	604-042-00-6	612-148-00-9
015-072-00-9	604-055-00-7	613-048-00-8
023-001-00-8	605-016-00-7	613-049-00-3
024-012-00-0	609-020-00-X	613-140-00-8
602-002-00-2	612-033-00-3	615-023-00-7

ANEXA 1F

Nr. de index

048-003-00-6	048-007-00-8	603-066-00-4
048-004-00-1	602-025-00-8	
048-005-00-7	603-029-00-2	

ANEXA 1G

Nr. de index

015-015-00-8

ANEXA 1H

Nr. de index

603-001-00-X

ANEXA 1I

Nr. de index

016-023-00-4	605-020-00-9	611-001-00-6
601-048-00-0	609-007-00-9	612-035-00-4
603-063-00-8	609-049-00-8	612-051-00-1

ANEXA 1J

Nr. de index		
604-005-00-4	612-145-00-2	612-146-00-8

ANEXA 2

ANEXO II — BILAG II — ANHANG II — ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II — ANNEX II — ANNEXE II — ALLEGATO II — BIJLAGE II — ANEXO II — LIITE II — BILAGA II

ANEXO II

Símbolos e indicaciones de peligro de las sustancias y preparados peligrosos

BILAG II

Faresymboler og farebetegnelser for farlige stoffer og præparater

ANHANG II

Gefahrensymbole und -bezeichnungen für gefährliche Stoffe und Zubereitungen

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Σύμβολα και ενδείξεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα

ANNEX II

Symbols and indications of danger for dangerous substances and preparations

ANNEXE II

Symboles et indications de danger des substances et préparations dangereuses

ALLEGATO II

Simboli e indicazioni di pericolo delle sostanze e preparati pericolosi

BIJLAGE II

Gevaarsymbolen en -aanduidingen van gevaarlijke stoffen en preparaten

ANEXO II

Símbolos e indicações de perigo das substâncias e preparações perigosas

LIITE II

Varoitusmerkit ja niiden nimet vaarallisille aineille ja valmisteille

BILAGA II

Farosymboler och farobeteckningar för farliga ämnen och beredningar

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

ANEXA 3

ANEXO III — BILAG III — ANHANG III — ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III — ANNEX III — ANNEXE III — ALLEGATO III — BIJLAGE III — ANEXO III — LIITE III — BILAGA III

ANEXO III

Naturaleza de los riesgos específicos atribuidos a las sustancias y preparados peligrosos

BILAG III

Arten af de særlige risici, der er forbundet med de farlige stoffer og præparater

ANHANG III

Bezeichnungen der besonderen Gefahren bei gefährlichen Stoffen und Zubereitungen

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

Φύση των ειδικών κινδύνων που αφορούν επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα

ANNEX III

Nature of special risks attributed to dangerous substances and preparations

ANNEXE III

Nature des risques particuliers attribués aux substances et préparations dangereuses

ALLEGATO III

Natura dei rischi specifici attribuiti alle sostanze e preparati pericolosi

BIJLAGE III

Aard der bijzondere gevaren toegeschreven aan gevaarlijke stoffen en preparaten

ANEXO III

Natureza dos riscos específicos atribuídos às substâncias e preparações perigosas

LIITE III

Erityisten vaarojen luonne liittyen vaarallisiin aineisiin ja valmisteisiin

BILAGA III

Riskfraser som tilldelas farliga ämnen och beredningar

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

ANEXA 4

ANEXO IV — BILAG IV — ANHANG IV — ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV — ANNEX IV — ANNEXE IV — ALLEGATO IV — BIJLAGE IV — ANEXO IV — LIITE IV — BILAGA IV

ANEXO IV

Consejos de prudencia relativos a las sustancias y preparados peligrosos

BILAG IV

Forsigtighedsregler for farlige stoffer og præparater

ANHANG IV

Sicherheitsratschläge für gefährliche Stoffe und Zubereitungen

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Οδηγίες ασφαλούς χρήσης που αφορούν επικίνδυνες χημικές ουσίες και παρασκευάσματα

ANNEX IV

Safety advice concerning dangerous substances and preparations

ANNEXE IV

Conseils de prudence concernant les substances et préparations dangereuses

ALLEGATO IV

Consigli di prudenza riguardanti le sostanze e preparati pericolosi

BIJLAGE IV

Veiligheidsaanbevelingen met betrekking tot gevaarlijke stoffen en preparaten

ANEXO IV

Conselhos de prudência relativos a substâncias e preparações perigosas

LIITE IV

Vaarallisten aineiden ja valmisteiden turvallisuusohjeet

BILAGA IV

Skyddsfraser för farliga ämnen och beredningar

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

ANEXA 5A

EN: B.13/14. Mutagenicity - reverse mutation test using bacteria.

(Nu privește versiunea ES)

(Nu privește versiunea DA)

(Nu privește versiunea DE)

(Nu privește versiunea EL)

(Nu privește versiunea FR)

(Nu privește versiunea IT)

(Nu privește versiunea NL)

(Nu privește versiunea PT)

(Nu privește versiunea FI)

(Nu privește versiunea SV)

ANEXA 5B

FR: L'administration du témoin positif par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai est acceptable.

(Nu privește versiunea ES)

(Nu privește versiunea DA)

(Nu privește versiunea DE)

(Nu privește versiunea EL)

(Nu privește versiunea EN)

(Nu privește versiunea IT)

(Nu privește versiunea NL)

(Nu privește versiunea PT)

(Nu privește versiunea FI)

(Nu privește versiunea SV)

ANEXA 5C

EN: $t(\text{min}) = \frac{\text{Irradiation dose } (\text{J/cm}^2 \times 1000)}{\text{Irradiance } (\text{mW/cm}^2 \times 60)} (1\ \text{J} = 1\ \text{W sec})$

(Nu privește versiunea ES)

(Nu privește versiunea DA)

(Nu privește versiunea DE)

(Nu privește versiunea EL)

(Nu privește versiunea FR)

(Nu privește versiunea IT)

(Nu privește versiunea NL)

(Nu privește versiunea PT)

(Nu privește versiunea FI)

(Nu privește versiunea SV)

ANEXA 5D

B.26 TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ

STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE

1. **METODA**

Această metodă de testare a toxicității orale subcronice reproduce Orientarea 408 a OCDE (1998).

1.1. INTRODUCERE

La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unui produs chimic, determinarea toxicității orale subcronice folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate acută sau teste de toxicitate de 28 de zile cu doză repetată. Studiul de 90 de zile furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate ce pot fi antrenate de expunerea repetată pe o perioadă îndelungată, care se extinde de la înțărcare până la vârsta adultă. Studiul furnizează informații asupra efectelor toxice majore, indicând organele-țintă și posibilitatea de acumulare, și poate furniza și o estimare a nivelului de expunere la risc la care nu se observă efecte adverse, care poate fi folosită în alegerea dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii la risc a oamenilor.

Această metodă de testare pune un accent suplimentar pe efectele neurologice și furnizează indicii despre efectele imunologice și de reproducere. Se subliniază de asemenea necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină numărul maxim posibil de informații. Studiul ar trebui să aibă în vedere identificarea substanțelor care au potențialul de a produce efecte neurotoxice sau imunologice ori efecte asupra organelor de reproducere, ceea ce ar justifica efectuarea în continuare a unor studii mai aprofundate.

A se vedea și Introducerea generală, partea B.

1.2. DEFINIȚII

Doza: este cantitatea de substanță testată administrată. Doza este exprimată ca greutate (g, mg) sau ca greutatea substanței testate raportată la unitatea de greutate a animalului de laborator (de exemplu, mg/kg) ori ca o concentrație constantă în alimentație (ppm).

Dozajul: este un termen general care cuprinde doza, frecvența acesteia și durata administrării.

DFEAO: este abrevierea pentru „doza fără efecte adverse observabile” (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level) și reprezintă doza maximă la care nu s-au constatat stări adverse legate de tratament.

1.3. PRINCIPIUL METODEI

Diferite doze din substanța testată se administrează zilnic, pe cale orală, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 90 de zile. În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în timpul testului sunt autopsiate și la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare sunt de asemenea sacrificate și autopsiate.

1.4. DESCRIEREA METODEI

1.4.1. **Pregătirea animalelor**

Trebuie folosite animale sănătoase, care au fost acomodate la condițiile de laborator timp de minimum 5 zile și nu au mai fost folosite în alte experiențe. Trebuie precizate specia, sușa, proveniența, sexul, greutatea și vârsta. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. Cuștile se amplasează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate modului lor de dispunere. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic.

1.4.2. **Pregătirea dozelor**

Substanța testată se administrează prin introducerea în stomac cu ajutorul unei sonde sau prin alimente ori apa de băut. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico-chimice ale substanței testate.

Acolo unde este necesar, substanța testată se dizolvă sau se trece în suspensie într-un purtător adecvat. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia mai întâi în considerare folosirea unei soluții/suspensii apoase, urmată de o soluție/emulsie în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și în cele din urmă de o soluție în alți purtători. Trebuie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale purtătorilor alții decât apa. Se determină stabilitatea substanței testate în condițiile de administrare.

1.4.3. **Condițiile de lucru**

1.4.3.1. *Animalele de laborator*

Specia preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Este recomandabil să se folosească animale adulte tinere, sănătoase, provenind din sușe de laborator obișnuite. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie însărcinate. Administrarea începe cât mai curând posibil după înțărcare și în nici un caz mai târziu de vârsta de nouă săptămâni. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite trebuie să fie minime și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex. Atunci când studiul este efectuat în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, în ambele studii trebuie folosite animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

1.4.3.2. *Numărul și sexul animalelor*

La fiecare nivel al dozei se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs, numărul trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate pentru sacrificare înainte de sfârșitul studiului. Pe baza cunoștințelor existente despre produsul chimic sau un produs foarte asemănător, ar trebui să se ia în considerare includerea unui grup satelit suplimentar de 10 animale (5 de fiecare sex) în grupul martor și în grupul tratat cu doza cea mai puternică, pentru a observa, după tratament, reversibilitatea sau persistența oricărui efect toxic. Durata perioadei posttratament se fixează în funcție de efectele observate.

1.4.3.3. *Dozajul*

Dozele folosite sunt la minimum trei niveluri și există un grup martor, în afara cazului în care se face un test la valori limită (a se vedea punctul 1.4.3.4). Nivelul dozelor este stabilit în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată sau ale studiilor preliminare și iau în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța testată sau substanțe înrudite. Dacă nu există limitări datorate proprietăților fizico-chimice sau efectelor biologice ale substanței, este recomandabil să se aleagă doza maximă care induce efectul toxic, dar nu și moartea sau suferința severă. Se alege o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra legătura între răspuns și nivelul dozei, precum și nivelul dozei fără efecte adverse observabile (DFEAO), în cazul celei mai mici doze. În mod frecvent, se dovedește că la formarea seriei descrescătoare a dozelor este optimă progresia geometrică cu rația 2-4 și deseori adăugarea unui al patrulea grup de probă este preferabil folosirii unor rații foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze.

Grupul martor este un grup netratat sau tratat cu purtător, dacă se folosește un purtător la administrarea substanței testate. Cu excepția substanței testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile de probă. Dacă se folosește un purtător, grupul martor primește purtătorul în cantitatea maximă folosită. Dacă substanța testată se administrează în alimente și provoacă reducerea apetitului, un grup martor hrănit în paralel se poate dovedi folositor pentru a determina dacă reducerea se datorează modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor sau alterărilor toxicologice din organismul animalelor de laborator.

Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale purtătorului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice și efectele asupra consumului de hrană sau apă ori asupra stării de nutriție a animalelor.

1.4.3.4. *Testul la valori limită*

Dacă testul efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodologia descrisă pentru acest studiu, nu produce efecte adverse observabile și toxicitatea nu este de așteptat în baza datelor existente pentru substanțele înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Testul la valori limită este aplicabil cu excepția cazului în care expunerea oamenilor arată că este necesară folosirea unei doze mai mari.

1.5. MODUL DE LUCRU

1.5.1. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța testată zilnic, șapte zile în fiecare săptămână, pentru o perioadă de 90 de zile. Orice alt regim de dozare, de exemplu, cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. Când substanța testată se administrează cu ajutorul sondei introduse în stomac, se administrează toată doza o dată fiecărui animal, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de mărimea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, cu excepția soluțiilor apoase, când se pot folosi 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor iritante sau corozive, care provoacă în mod obișnuit efecte exacerbate la concentrații mai mari, este recomandabil ca variațiile în volumul probei să fie reduse la minimum, ajustându-se concentrația astfel încât să se asigure un volum constant, indiferent de nivelul dozei.

Pentru substanțele administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Când substanța testată este administrată în alimente, se folosește fie o concentrație constantă în alimente (ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului; alternativa folosită trebuie specificată. În cazul folosirii sondei, doza trebuie administrată aproximativ în același moment al zilei și ajustată după necesități, pentru a rămâne constantă în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când un studiu de 90 de zile este folosit în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, se recomandă folosirea unei alimentații asemănătoare în ambele studii.

1.5.2. **Observațiile**

Perioada de observație se recomandă să fie de minimum 90 de zile. Animalele din grupul satelit programat pentru observație ulterioară trebuie să nu primească tratament o perioadă adecvată, pentru a detecta persistența sau reversibilitatea efectelor toxice.

Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Se recomandă înregistrarea stării clinice a animalelor. Cel puțin de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, toate animalele sunt examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate.

Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și apoi o dată pe săptămână. Aceste examene se recomandă să fie făcute în afara cuștii, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele se consemnează cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Trebuie acționat astfel încât variația condițiilor de observare să fie minimă. Simptomele urmărite cuprind, fără a se limita la ele, schimbări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, frecvența secrețiilor și a excrețiilor, ca și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, modificarea pupilelor, respirația anormală). Este recomandabil să fie observate de asemenea schimbările în mers, ținută și reacție la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi) (1).

Examinarea oftalmologică, cu un oftalmoscop sau un aparat echivalent adecvat, de preferat a tuturor animalelor dar cel puțin a animalelor din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor, trebuie efectuată înainte de administrarea substanței testate și la încheierea studiului. Dacă se constată modificări ale ochilor, toate animalele trebuie examinate.

Spre sfârșitul perioadei de expunere și în orice caz nu înainte de săptămâna 11, se evaluează reactivitatea senzorială la diferite tipuri de stimuli (1) (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali, proprioceptivi) (2), (3), (4), se evaluează forța de apucare (5) și activitatea motorie (6). Detalii suplimentare referitoare la metodele utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Se pot folosi și metode diferite de cele menționate.

Observațiile funcționale pot fi omise spre sfârșitul studiului atunci când sunt disponibile date despre observațiile funcționale din alte studii și observațiile clinice zilnice nu au evidențiat deficite funcționale.

În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi de asemenea omise pentru grupurile care, pe de altă parte, prezintă simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar interfera semnificativ cu desfășurarea testului funcțional.

1.5.2.1. *Greutatea corporală și consumul de hrană/apă*

Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Dacă substanța testată se administrează în apa de băut, se măsoară și apa de băut cel puțin săptămânal. Este recomandabil să se măsoare consumul de apă și în studiile cu substanță testată administrată în alimente sau prin sondă, atunci când băutul apei poate suferi modificări.

1.5.2.2. *Hematologia și biochimia clinică*

Se prelevează probe de sânge din puncte determinate și se conservă, dacă este cazul, în condiții adecvate. La sfârșitul perioadei de testare, probele se colectează imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri.

La sfârșitul perioadei de testare și atunci când se colectează probe de sânge pe parcurs, se procedează la următoarele examene hematologice: hematocrit, concentrație de hemoglobină, numărătoarea eritrocitelor și a leucocitelor, formula leucocitară, numărătoarea plachetelor sangvine, măsurarea timpului de coagulare.

Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la fiecare animal imediat înainte de sacrificare sau ca parte a acestei proceduri (dar nu de la cele găsite muribunde sau care au fost sacrificate pe parcurs). Ca și la investigațiile hematologice, se pot recolta pe parcurs probe pentru analize de biochimie chimică. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană în timpul nopții dinainte de recoltare ([1]). Analizele de plasmă sau ser cuprind sodiu, potasiu, glucoză, colesterol total, uree, acid uric în sânge, creatinină, proteine și albumine totale și mai mult de două enzime indicând efectele hepatocelulare (ca alaninaminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gamaglutamiltranspeptidaza și sorbitol dehidrogenaza). Pot fi incluse și măsurători ale altor enzime (hepatice sau de altă origine) și ale acizilor biliari, care pot furniza informații utile în anumite situații.

Opțional, pot fi efectuate următoarele analize de urină în ultima săptămână a studiului, folosind probe de urină prelevate după un anumit orar: aspect, volum, osmolaritate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

În plus, trebuie avute în vedere investigații asupra constantelor plasmatice ale leziunilor generale ale țesuturilor. Dacă proprietățile cunoscute ale substanței testate pot sau se apreciază că pot să afecteze curbele metabolice conexe, trebuie efectuate și alte analize, cum sunt: calciu, fosfor, trigliceride à jeun, hormoni specifici, methemoglobină și colinesterază. Acestea trebuie identificate pentru substanțele chimice din anumite clase sau de la caz la caz.

În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de specii și de efectele constatate și scontate ale substanței în cauză.

Dacă datele istorice de referință sunt insuficiente, este cazul să se ia în considerare necesitatea de a determina variabilele hematologice și de biochimie clinică înainte de începerea administrării; în general, nu se recomandă ca aceste date să se obțină înaintea tratamentului (7).

1.5.2.3. *Autopsia*

Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, uterul, ovarele, timusul, splina, creierul și inima fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

([1]) Pentru mai multe analize de ser și plasmă, în special pentru glucoză, este de preferat absența hranei în timpul nopții. Cel mai important motiv este că variația crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efectele mai subtile și ar face dificilă interpretarea. Pe de altă parte însă, lipsa hranei pe durata nopții poate să interfereze cu metabolismul general al animalelor și riscă, în special în studiile în care substanța testată este administrată în alimente, să perturbe expunerea zilnică la această substanță. Dacă se optează pentru lipsa hranei pe timpul nopții, trebuie efectuate analize de biochimie clinică după observațiile funcționale ale studiului.

Țesuturile următoare se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut cât și pentru examenul histopatologic prevăzut: toate organele prezentând leziuni macroscopice, creierul (regiunile reprezentative, cuprinzând encefalul, cerebelul și trunchiul cerebral), măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar), hipofiza, glanda tiroidă, glandele paratiroide, timusul, esofagul, glandele salivare, stomacul, intestinul subțire și intestinul gros (inclusiv plăcile lui Peyer), ficatul, pancreasul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, traheea și plămânii (conservați prin exces de fixativ și apoi imersie) aorta, gonadele, uterul, organele genitale anexe, glanda mamară feminină, prostata, vezica urinară, vezica biliară (șoarece), ganglionii limfatici (de preferință un ganglion limfatic din zona afectată de calea de administrare și un alt ganglion limfatic din altă zonă, aflată la distanță, pentru a detecta eventualele efecte sistemice), nervii periferici (sciatic sau tibial), de preferat din apropierea mușchiului, o probă de măduvă osoasă (și o puncție aspirativă de măduvă osoasă examinată pe loc), piele și ochi (dacă s-au constat modificări la examenele oftalmologice). Observațiile clinice și cele macroscopice pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

1.5.2.4. *Histopatologia*

Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene trebuie extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

Se examinează toate leziunile macroscopice.

Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

2. REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA

2.1. REZULTATELE

Rezultatele se prezintă individual. În plus, toate rezultatele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umanitare și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, inclusiv momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune.

Dacă este cazul, rezultatele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și rezultatele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de redactare a protocolului de testare.

2.2. RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului cuprinde următoarele informații:

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică, puritatea si proprietățile fizico-chimice;

— datele de identificare chimică;

— purtătorul (dacă este cazul); justificarea alegerii purtătorului dacă este altul decât apa.

2.2.2. **Animalele de laborator:**

— specia și sușa folosite;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea individuală a animalelor la începutul testului.

2.2.3. **Condițiile de lucru:**

— motivația alegerii dozelor;

— detalii privind preparatul hrană/rețeta substanței testate, concentrația realizată, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței testate;

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrația în hrană sau apa de băut (ppm) în doza reală, dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

2.2.4. **Rezultatele:**

— greutatea corporală și modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană si apă, dacă este cazul;

— rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;

— natura, severitatea și durata efectelor observate clinic (reversibile sau nu);

— rezultatele examenului oftalmologic;

— activitatea senzorială, forța de apucare, aprecierea activității motorii (dacă sunt disponibile);

— valorile hematologice și valorile de referință corespunzătoare;

— valorile de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;

— greutatea corporală la moartea animalului, greutățile organelor interne, raporturile dintre greutatea organului intern și greutatea corporală;

— constatările de la autopsie;

— o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— date privind absorbția, dacă sunt disponibile;

— prelucrarea statistică a rezultatelor, unde este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(1) IPCS (1986). Principles 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, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V. C., Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C., Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 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, pp. 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, pp. 198-201.

ANEXA 5E

B.27 TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ

STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA NEROZĂTOARE

1. **METODA**

Această metodă de testare a toxicității orale subcronice reproduce Orientarea 409 a OCDE (1998).

1.1. INTRODUCERE

La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unui produs chimic, determinarea toxicității orale subcronice folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate acută sau teste de toxicitate de 28 de zile cu doză repetată. Studiul de 90 de zile furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată la risc pe o perioadă îndelungată, care se extinde de la înțărcare până la vârsta adultă. Studiul furnizează informații asupra efectelor toxice majore, indicând organele-țintă și posibilitatea de acumulare și poate furniza și o estimare a nivelului de expunere la care nu se observă efecte adverse, care poate fi folosită în alegerea dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii la risc a oamenilor.

Metoda are în vedere identificarea la speciile nerozătoare a efectelor adverse ale expunerii chimice și se folosește doar:

— în cazul în care efectele observate în alte studii indică necesitatea unei clarificări/caracterizări cu ajutorul unei a doua specii, nerozătoare sau

— în cazul în care studiile toxico-cinetice indică faptul că folosirea unei anumite specii nerozătoare reprezintă cea mai relevantă alegere a animalului de laborator sau

— în cazul în care alte anumite motive justifică folosirea unei specii nerozătoare.

A se vedea și Introducerea generală, partea B.

1.2. DEFINIȚII

Doză: este cantitatea de substanță testată administrată. Doza este exprimată ca greutate (g, mg) sau ca greutatea substanței testate pe unitatea de greutate a animalului de laborator (de exemplu, mg/kg) sau în concentrații constante în alimentație (ppm).

Dozaj: este un termen general care cuprinde doza, frecvența acesteia și durata administrării.

DFEAO: este abrevierea pentru „doza fără efecte adverse observabile” (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level) și reprezintă doza maximă la care nu s-au constatat stări adverse legate de tratament.

1.3. PRINCIPIUL METODEI

Diferite doze din substanța testată se administrează zilnic, pe cale orală, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 90 de zile. În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în timpul testului sunt autopsiate și la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare sunt de asemenea sacrificate și autopsiate.

1.4. DESCRIEREA METODEI

1.4.1. **Alegerea speciei animale**

Specia nerozătoare folosită în mod obișnuit este câinele, care trebuie să fie de rasă definită; frecvent este folosit basetul. Pot fi folosite și alte specii, de exemplu porcul sau porcul pitic. Nu se recomandă primatele, iar folosirea lor trebuie justificată. Trebuie folosite animale tinere și sănătoase, iar în cazul câinelui administrarea trebuie să înceapă de preferință la vârsta de 4-6 luni și nu mai târziu de vârsta de nouă luni.

Atunci când studiul este efectuat în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, în ambele studii trebuie folosite animale din aceeași specie/rasă.

1.4.2. **Pregătirea animalelor**

Trebuie folosite animale tinere și sănătoase, care au fost acomodate la condițiile de laborator și care nu au mai fost folosite în alte experiențe. Durata aclimatizării depinde de specia aleasă și de proveniența sa. Se recomandă cel puțin cinci zile pentru câini sau pentru porci hrăniți anume în acest scop în colonia laboratorului și cel puțin două săptămâni pentru aceleași animale din surse externe. Trebuie precizate specia, sușa, proveniența, sexul, greutatea și vârsta. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. Cuștile se amplasează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate modului lor de dispunere. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic.

1.4.3. **Pregătirea dozelor**

Substanța testată se administrează în alimente sau în apa de băut ori prin introducerea în stomac cu ajutorul unei sonde sau în capsule. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico-chimice ale substanței testate.

Acolo unde este necesar, substanța testată se dizolvă sau se trece în suspensie într-un purtător adecvat. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia mai întâi în considerare folosirea unei soluții/suspensii apoase, urmată de o soluție/emulsie în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și în cele din urmă de o soluție în alți purtători. Trebuie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale purtătorilor, alții decât apa. Trebuie determinată stabilitatea substanței testate în condițiile de administrare.

1.5. MODUL DE LUCRU

1.5.1. **Numărul și sexul animalelor**

La fiecare nivel al dozei se folosesc cel puțin opt animale (patru femele și patru masculi). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs, numărul trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de sfârșitul testului. Numărul animalelor la încheierea studiului trebuie să fie adecvat pentru ca evaluarea efectelor toxice să aibă semnificație. Pe baza cunoștințelor existente despre produsul chimic sau un produs foarte asemănător, ar trebui să se ia în considerare includerea unui grup satelit suplimentar de opt animale (patru de fiecare sex) în grupul martor și în grupul tratat cu doza cea mai puternică, pentru a observa, după tratament, reversibilitatea sau persistența oricărui efect toxic. Durata perioadei posttratament se fixează în funcție de efectele observate.

1.5.2. **Dozajul**

Dozele folosite sunt la minimum trei niveluri și există un grup martor, în afara cazului în care se face un test la valori limită (a se vedea 1.5.3). Nivelul dozelor se stabilește în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată sau ale studiilor preliminare și ia în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța testată sau substanțe înrudite. Dacă nu există limitări datorate proprietăților fizico-chimice sau efectelor biologice ale substanței, este recomandabil să se aleagă doza maximă care induce efectul toxic, dar nu și moartea sau suferința severă. Se alege o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra legătura între răspuns și nivelul dozei precum și nivelul dozei fără efecte adverse observabile (DFEAO), în cazul celei mai mici doze. În mod frecvent, se dovedește că, la formarea seriei descrescătoare a dozelor, este optimă progresia geometrică cu rația 2-4 și deseori adăugarea unui al patrulea grup de testare este preferabil folosirii unor rații foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze.

Grupul martor este un grup netratat sau tratat cu purtătorul, dacă se folosește un purtător la administrarea substanței testate. Cu excepția substanței testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se folosește un purtător, grupul martor primește purtătorul în cantitatea maximă folosită. Dacă substanța testată se administrează în alimente și provoacă reducerea apetitului, un grup martor hrănit în paralel se poate dovedi folositor pentru a determina dacă reducerea de datorează modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor sau alterărilor toxicologice din organismul animalelor de laborator.

Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale purtătorului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării de nutriție a animalelor.

1.5.3. **Testul la valori limită**

Dacă testul efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodele experimentale descrise pentru acest studiu, nu produce efecte adverse observabile și dacă toxicitatea nu este de așteptat în baza datelor existente pentru substanțele înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Testul la valori limită este aplicabil cu excepția cazului în care expunerea oamenilor arată că este necesară folosirea unei doze mai mari.

1.5.4. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța testată zilnic, șapte zile în fiecare săptămână, pentru o perioadă de 90 de zile. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. Când substanța testată se administrează cu ajutorul sondei introduse în stomac, se administrează toată doza o dată fiecărui animal, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de mărimea animalului de laborator. În mod normal, volumul trebuie menținut cât mai scăzut posibil. Cu excepția substanțelor iritante sau corozive, care provoacă în mod obișnuit efecte exacerbate la concentrații mai mari, este recomandabil ca variațiile în volumul probei să fie reduse la minimum, ajustându-se concentrația astfel încât să asigure un volum constant, indiferent de nivelul dozei.

Pentru substanțele administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Când substanța testată este administrată în alimente, se poate folosi fie o concentrație constantă în alimente (ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului; alternativa folosită trebuie specificată. În cazul administrării prin sondă sau în capsulă, doza trebuie administrată aproximativ în același moment al zilei și ajustată după necesități, pentru a rămâne constantă în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când un studiu de 90 de zile este folosit în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, se recomandă folosirea unei alimentații asemănătoare în ambele studii.

1.5.5. **Observațiile**

Perioada de observație se recomandă să fie de minimum 90 de zile. Animalele din grupul satelit programat pentru observații ulterioare trebuie să nu primească tratament o perioadă adecvată, pentru a detecta persistența sau reversibilitatea efectelor toxice.

Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Se recomandă înregistrarea stării clinice a animalelor. Cel puțin de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, toate animalele sunt examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate.

Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și apoi o dată pe săptămână. Aceste examene se recomandă să fie făcute, dacă e posibil, în afara cuștii, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Trebuie acționat astfel încât variația condițiilor de observare să fie minimă. Simptomele de toxicitate trebuie să fie consemnate cu atenție, incluzând ora apariției, gradul și durata acestora. Observațiile cuprind, fără a se limita la ele, schimbări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, frecvența secrețiilor și a excrețiilor, ca și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, modificarea pupilelor, respirația anormală). Este recomandabil să fie observate de asemenea schimbările în mers, ținută și reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare.

Examinarea oftalmologică, cu un oftalmoscop sau un aparat echivalent adecvat, de preferat a tuturor animalelor și cel puțin a animalelor din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor, trebuie efectuată înainte de administrarea substanței testate și la încheierea studiului. Dacă se constată modificări ale ochilor legate de tratament, toate animalele trebuie examinate.

1.5.5.1. *Greutatea corporală și consumul de hrană/apă*

Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Dacă substanța testată se administrează în apa de băut, se măsoară și apa de băut cel puțin săptămânal. Este recomandabil să se măsoare consumul de apă și în studiile cu substanța testată administrată în alimente sau prin sondă, atunci când băutul apei poate suferi modificări.

1.5.5.2. *Hematologia și biochimia clinică*

Se prelevează probe de sânge din puncte determinate și se conservă, dacă este cazul, în condiții adecvate. La încheierea testului, probele se colectează imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri.

Se procedează la următoarele examene hematologice: hematocrit, concentrație de hemoglobină, numărătoarea eritrocitelor și a leucocitelor, formula leucocitară, numărătoarea plachetelor sangvine și o măsurare a potențialului de coagulare, cum sunt timpul de coagulare, timpul de protombină sau de tromboplastină, la începutul studiului și apoi la intervale lunare sau la jumătatea perioadei de testare și, în cele din urmă, la încheierea testului.

Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la toate animalele la începutul studiului, la intervale lunare sau la jumătatea perioadei de testare și la încheierea testului. Domeniile de analiză care trebuie luate în considerare sunt balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților și funcțiile hepatică și renală. Alegerea analizelor specifice este influențată de observațiile asupra modului de acțiune a substanței testate. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană pentru o perioadă adecvată speciei înainte de prelevarea probei de sânge. Analizele recomandabile cuprind măsurarea următoarelor: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoză à jeun, alaninaminotransferază, aspartat aminotransferază, ornitin decarboxilază, gamaglutamiltranspeptidază, acid uric, albumină, creatinină sangvină, bilirubină totală și proteine serice totale.

Analizele de urină trebuie efectuate cel puțin la început, apoi la jumătatea perioadei și la încheierea testului, folosind probe de urină prelevate după un anumit orar. Analizele cuprind: aspect, volum, osmolaritate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie. Se pot folosi și alți parametri dacă este necesar să se extindă investigarea efectului (efectelor) observat(e).

În plus, trebuie avute în vedere investigații asupra constantelor plasmatice ale leziunilor generale ale țesuturilor. Alte analize care se pot dovedi necesare pentru o evaluare toxicologică adecvată includ: analiza lipidelor, a hormonilor, echilibrul acido-bazic, methemoglobina și inhibarea colinesterazei. Pot fi folosite analize de biochimie clinică suplimentare, dacă este necesar să se extindă investigarea efectelor observate. Acestea trebuie identificate pentru substanțele din anumite clase sau de la caz la caz.

În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de specii și de efectele constatate și scontate ale substanței în cauză.

1.5.5.3. *Autopsia*

Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, ovarele, uterul, glanda tiroidă (cu glandele paratiroide) timusul, splina, creierul și inima fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

Țesuturile următoare trebuie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut cât și pentru examenul histopatologic prevăzut: toate organele prezentând leziuni macroscopice, creierul (regiunile reprezentative, cuprinzând encefalul, cerebelul și trunchiul cerebral), măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar), hipofiza, ochii, glanda tiroidă, glandele paratiroide, timusul, esofagul, glandele salivare, stomacul, intestinul subțire și intestinul gros (inclusiv plăcile lui Peyer), ficatul, vezica biliară, pancreasul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, traheea și plămânii, aorta, gonadele, uterul, organele genitale anexe, glanda mamară feminină, prostata, vezica urinară, ganglionii limfatici (de preferință un ganglion limfatic din zona afectată de calea de administrare și un alt ganglion limfatic din altă zonă, aflată la distanță, pentru a detecta eventualele efecte sistemice), nervii periferici (sciatic sau tibial), de preferat din apropierea mușchiului, o probă de măduvă osoasă (și/sau o puncție aspirativă de măduvă osoasă

examinată pe loc), piele. Observațiile clinice și cele macroscopice pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

1.5.5.4. *Histopatologia*

Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor conservate ale tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene trebuie extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

Se examinează toate leziunile macroscopice.

Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

2. REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA

2.1. REZULTATELE

Rezultatele se prezintă individual. În plus, toate rezultatele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umanitare și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune.

Dacă este cazul, rezultatele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și rezultatele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de redactare a protocolului de testare.

2.2. RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului cuprinde următoarele informații:

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică, puritatea si proprietățile fizico-chimice,

— datele de identificare chimică,

— purtătorul (dacă este cazul); justificarea alegerii purtătorului dacă este altul decât apa.

2.2.2. **Animalele de laborator:**

— specia și sușa folosite,

— numărul, vârsta și sexul animalelor,

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.,

— greutatea individuală a animalelor la începutul testului.

2.2.3. **Condițiile de lucru:**

— motivația alegerii dozelor,

— detalii privind preparatul hrană/rețeta substanței testate, concentrația realizată, stabilitatea și omogenitatea preparatului,

— detalii privind administrarea substanței testate,

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa de băut (ppm) în doza reală, dacă este cazul,

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

2.2.4. **Rezultatele:**

— greutatea corporală și modificările în greutatea corporală,

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul,

— rezultate privind reacția toxică, pe sexe și nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate,

— natura, severitatea și durata efectelor observate clinic (reversibile sau nu),

— rezultatele examenului oftalmologic,

— valorile hematologice și valorile de referință corespunzătoare,

— valorile de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare,

— greutatea corporală la moartea animalului, greutățile organelor interne, raporturile greutatea organului intern/greutate corporală,

— constatările de la autopsie,

— o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice,

— date privind absorbția, dacă sunt disponibile,

— prelucrarea statistică a rezultatelor, unde este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

ANEXA 5F

C.14. TESTUL DE CREŞTERE A PUIETULUI DE PEŞTE

1. METODA

Metoda de testare a influenței toxicității asupra creșterii reproduce Orientarea 215 a OCDE (2000).

1.1. INTRODUCERE

Acest test urmărește să evalueze efectele expunerii prelungite la produse chimice asupra creșterii puietului de pește. Are la bază o metodă, elaborată și intercalibrată (1) (3) în Uniunea Europeană, de evaluare a efectelor produselor chimice asupra puietului de păstrăv-curcubeu (*Oncorynchus mykiss*) în regim dinamic. Pot fi folosite și alte specii, dacă au fost bine studiate. De exemplu, s-a câștigat experiență din testele de creștere cu peștele-zebră (*Danio rerio*) (2) (4) (5) și medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

A se vedea și Introducerea generală, partea C.

1.2. DEFINIȚII

Concentrația minimă cu efect observabil (CMEO): este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect semnificativ (la $p < 0,05$) în comparație cu lotul martor. Toate concentrațiile mai mari decât CMEO trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la CMEO.

Concentrația fără efecte observabile (CFEO): este concentrația testată imediat sub valoarea CMEO.

CE_x: în această metodă de testare este concentrația substanței testate care provoacă o variație de x % în rata de creștere a peștelui în comparație cu lotul martor.

Rata de încărcare: este greutatea peștelui pe unitatea de volum de apă.

Densitatea populației: este numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Rata de creștere specifică individuală: exprimă rata de creștere a unui individ, prin raportare la greutatea sa inițială.

Rata de creștere specifică medie a bazinului: exprimă rata de creștere medie a populației din bazin la o concentrație dată.

Rata de creștere pseudospecifică: exprimă rata de creștere individuală raportată la greutatea inițială medie a populației din bazin.

1.3. PRINCIPIUL METODEI

Puietul piscicol aflat în faza de creștere exponențială este pus, după ce este cântărit, în incintele experimentale și expus la o gamă de concentrații subletale din substanța testată, dizolvată în apă, de preferință în regim dinamic sau, dacă nu este posibil, în condiții semistatice adecvate (regim de curgere discontinuă) Durata testului este de 28 de zile. Peștii sunt hrăniți zilnic. Rația alimentară este în funcție de greutățile corporale inițiale și poate fi recalculată după 14 zile. La sfârșitul testului, peștii sunt cântăriți din nou. Efectele asupra ratelor de creștere sunt analizate folosind un model de regresie, pentru a estima acea concentrație care ar avea ca efect o variație a ratei de creștere de x %, adică a CE_x (de exemplu, CE_{10}, CE_{20} sau CE_{30}). O altă variantă este ca datele să fie comparate cu valorile lotului martor, în scopul de a determina concentrația minimă cu efecte observabile (CMEO) și, de aici, concentrația fără efecte observabile (CFEO).

1.4. INFORMAȚII DESPRE SUBSTANȚA TESTATĂ

Trebuie să fie disponibile rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea metoda de testare C.1), de preferință efectuat cu speciile alese pentru acest test. Aceasta înseamnă că se cunosc solubilitatea în apă și presiunea de vapori ale substanței testate, precum și că există o metodă analitică fiabilă și disponibilă pentru cuantificarea substanței în soluții, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute și specificate în raport.

Informațiile utile cuprind: formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a, P_{oa} și rezultatele testului de biodegradabilitate rapidă (a se vedea metoda de testare C.4).

1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— mortalitatea în lotul (loturile) martor nu trebuie să depășească 10 % la sfârșitul testului;

— greutatea medie a peștilor în lotul (loturile) martor trebuie să fi crescut suficient pentru a permite detectarea variației minime a ratei de creștere considerată ca semnificativă. Un test de intercalibrare (3) a arătat că în cazul păstrăvului-curcubeu greutatea medie a peștelui în lotul martor trebuie să fi crescut în 28 de zile cu cel puțin jumătate (adică 50 %) din greutatea inițială; de exemplu, greutatea inițială: 1 g/pește (=100 %), greutatea finală, după 28 de zile: ≥ 1,5 g/pește (≥ 150 %);

— concentrația de oxigen dizolvat trebuie să fi fost pe toată durata testului de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);

— temperatura apei trebuie să nu difere cu mai mult de ± 1 °C între bazine în nici un moment pe durata testului și să fie menținută într-un interval de 2 °C în intervalele de temperatură specificate pentru speciile de pești (apendicele 1).

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Aparatura:**

Echipamentul obișnuit de laborator și în special următoarele:

(a) pH-metru și aparat de măsurare a oxigenului;

(b) echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;

(c) aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu supraveghere continuă;

(d) bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și densitatea populației recomandate (a se vedea punctul 1.8.5 și apendicele 1);

(e) balanță de precizie adecvată (adică până la ± 0,5 %).

1.6.2. **Apa**

În test poate fi folosită orice apă în care specia testată prezintă o rată de supraviețuire și de creștere pe termen lung corespunzătoare. Trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Apa trebuie să aibă un pH în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui test dat trebuie să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități de pH. Se recomandă o duritate (în $CaCO_3$) de peste 140 mg/l. Pentru ca apa de diluare să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu, prin complexare cu substanța testată), trebuie luate probe la intervale egale pentru analiză. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluare, se măsoară la interval de trei luni conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca, Mg, Na, K, Cl și SO_4), pesticide (de exemplu pesticide organofosforice totale și pesticide organoclorice totale), carbon organic total, solide în suspensie. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe o perioadă de cel puțin un an, analizele se pot face la intervale mai mari (de exemplu, la fiecare șase luni). Câteva caracteristici chimice ale unei ape de diluare acceptabile sunt enumerate în apendicele 2.

1.6.3. **Soluțiile de lucru**

Soluțiile de lucru de concentrații date se prepară prin diluarea unei soluții de bază.

Soluția de bază se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței testate în apa de diluare, folosind mijloace mecanice (de exemplu cu agitator sau ultrasunete). Pentru obținerea unei soluții de bază cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate).

În unele cazuri, folosirea solvenților sau a agenților de dispersie poate fi necesară pentru a realiza soluția de bază de concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilsulfoxidul, dimetilformamida și trietilenglicolul. Exemple de agenți de dispersie adecvați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Folosirea compușilor ușor biodegradabili

(de exemplu, acetona) și a compușilor foarte volatili trebuie să se facă atent, deoarece aceștia pot antrena proliferarea bacteriană în testele cu regim dinamic. Când se folosește agent de dispersie, acesta trebuie, în demonstrația pe un lot martor tratat numai cu solventul, să nu provoace efecte semnificative asupra creșterii peștilor și nici efecte adverse vizibile asupra puietului.

La testele în regim dinamic este necesar un sistem care să distribuie și să dilueze continuu soluția de bază a substanței testate (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura seria concentrațiilor din incintele experimentale. Debitele soluțiilor de bază și ale apei de diluare se verifică la intervale definite, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un test de intercalibrare (3) a demonstrat că, în cazul păstrăvului-curcubeu, o frecvență a schimbării apei de 6 litri/g de pește/zi este acceptabilă (a se vedea punctul 1.8.2.2).

La testele în regim semistatic (regim dinamic discontinuu), frecvența schimbării apei depinde de stabilitatea substanței testate, dar se recomandă schimbarea zilnică. Dacă testele de stabilitate preliminare (a se vedea punctul 1.4) arată o instabilitate a concentrației substanței testate (adică în afara intervalului de 80–120 % din concentrația nominală sau sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe parcursul schimbării apei, trebuie luată în considerare folosirea unui test în regim dinamic.

1.6.4. **Alegerea speciilor**

Păstrăvul-curcubeu (*Oncorynchus mykiss*) este specia recomandată pentru acest test deoarece de această specie se leagă cea mai mare parte a experienței câștigate în testele de intercalibrare (1) (3). Cu toate acestea, pot fi folosite și alte specii, bine studiate, dar metoda experimentală s-ar putea să necesite adaptări, pentru a asigura condiții de testare adecvate. De exemplu, există experiență disponibilă și cu peștele-zebră (*Danio rerio*) (4) (5) și cu medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). În acest caz, justificarea alegerii speciei și a metodei experimentale trebuie specificată în raport.

1.6.5. **Îngrijirea peștilor**

Peștii de laborator trebuie aleși din aceeași populație, de preferință din aceleași icre, care a fost îngrijită pentru cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare cu acelea folosite la test. Peștii trebuie hrăniți cu o rație minimă zilnică reprezentând 2 % din greutatea corporală, de preferință 4 %, pe întreaga durată de îngrijire și testare.

După o perioadă de acomodare de 48 de ore, se înregistrează mortalitatea și se aplică următoarele criterii:

— mortalitate mai ridicată de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;

— mortalitate între 5 % și 10 % din populație: acomodare pentru încă șapte zile; dacă mortalitatea este peste 5 % în a doua perioadă de șapte zile, se respinge întregul lot;

— mortalitate mai scăzută de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă lotul.

Peștii nu trebuie să primească tratament pentru boală în cele două săptămâni anterioare testului sau în timpul testului.

1.7. STRUCTURAREA TESTULUI

„Structurarea testului" se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de bazine pentru fiecare nivel al concentrației și la numărul de pești pe bazin. În mod ideal, structurarea testului ia în considerare:

(a) obiectivul studiului;

(b) metoda de analiză statistică urmând a fi folosită;

(c) disponibilitatea și costul resurselor alocate.

Enunțul obiectivului ar trebui, dacă este posibil, să specifice puterea statistică la care se cere să fie detectată mărimea unei diferențe date (de exemplu, în rata creșterii) sau, alternativ, precizia cu care se cere estimarea CE_x (de exemplu, cu x = 10, 20 sau 30 și de preferință nu mai mic decât 10). În absența acestor informații, nu se poate indica în mod precis scara de desfășurare a studiului.

Este important să se accepte ideea că structurarea optimă (care folosește cel mai bine resursele) în raport cu o metodă de analiză statistică nu este în mod necesar optimă în raport cu altă metodă. Structurarea recomandată pentru estimarea DMEO/DFEO nu va fi aceeași cu cea recomandată pentru analiza prin regresie.

În cele mai multe cazuri, analiza de regresie este preferabilă analizei de varianță, din motivele discutate de Stephan și Rogers (9). Cu toate acestea, atunci când nu se găsește un model de regresie corespunzător ($r^2 < 0,9$), ar trebui să se recurgă la DFEO/DMEO.

1.7.1. **Structurarea pentru analiza de regresie**

La structurarea unui test care urmează să fie interpretat cu ajutorul analizei de regresie, considerentele importante sunt:

(a) concentrațiile cu efect (de exemplu, $CE_{10,20,30}$) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie cu necesitate să fie cuprinse în test. Precizia cu care pot fi făcute estimările concentrațiilor cu efect va fi mai bună atunci când concentrația cu efect este la jumătatea intervalului de concentrații testate. În alegerea concentrațiilor adecvate pentru test este util un test preliminar de stabilire a intervalului;

(b) pentru a permite o modelare statistică satisfăcătoare, testul trebuie să includă cel puțin un bazin martor și alte cinci bazine la concentrații diferite. Unde este cazul, atunci când se folosește un agent de dispersie, se studiază, în afară de lotul testat, un lot martor dintr-un bazin conținând agentul de dispersie la concentrația maximă testată (a se vedea punctele 1.8.3 și 1.8.4);

(c) se poate folosi o serie geometrică sau una logaritmică adecvată (10) (a se vedea apendicele 3). Este de preferat seria logaritmică în definirea intervalelor între nivelurile concentrațiilor testate;

(d) dacă sunt disponibile mai mult de șase bazine, bazinele suplimentare ar trebui folosite fie la dublarea probelor, fie la distribuirea lor în intervalele de concentrații, în scopul îngustării acestora. Ambele măsuri sunt oportune în egală măsură.

1.7.2. **Structurarea pentru DFEO/DMEO folosind analiza de varianță**

Ar fi de preferat să existe bazine-dublură la fiecare concentrație, iar analiza statistică să se facă la nivelul fiecărui bazin (11). Fără bazine-dublură nu poate fi luată în considerare variabilitatea între bazine separat de variabilitatea de la un pește la altul. Cu toate acestea, experiența a arătat (12) că, în cazul examinat, variabilitatea între bazine a fost foarte scăzută comparativ cu cea din interiorul aceluiași bazin (adică între pești). Prin urmare, o alternativă relativ acceptabilă este efectuarea analizei statistice la nivelul fiecărui exemplar.

În mod convențional, se folosesc cel puțin cinci concentrații dispuse în serie geometrică, cu o rație care de preferință nu depășește 3,2.

În general, atunci când testele se fac cu bazine-dublură, numărul bazinelor martor, și prin urmare cel al peștilor, reprezintă dublul numărului de bazine testate la fiecare concentrație, iar acesta din urmă este același la toate concentrațiile (13) (14) (15). Dimpotrivă, în absența bazinelor-dublură, numărul peștilor din lotul martor este egal cu numărul peștilor folosiți la fiecare concentrație.

Dacă analiza de varianță urmează să pornească de la bazin și nu de la fiecare pește [ceea ce ar presupune fie marcarea individuală a peștilor, fie folosirea ratelor de creștere pseudospecifice (a se vedea punctul 2.1.2)], apare necesitatea folosirii unui număr suficient de dubluri pentru a se putea determina deviația standard a „bazinelor cu aceeași concentrație". Aceasta înseamnă că gradele de libertate pentru erorile din analiza de varianță trebuie să fie de minimum 5 (11). Dacă sunt dublate numai bazinele martor, există pericolul ca variabilitatea erorilor să fie falsificată, deoarece ea poate crește odată cu valoarea medie a ratei de creștere în cauză. Deoarece este probabil ca rata de creștere să scadă odată cu creșterea concentrației, se poate ajunge la o variabilitate supraestimată.

1.8. MODUL DE LUCRU

1.8.1. **Selectarea și cântărirea peștilor**

Este important ca variația în cântărirea peștilor să fie redusă la minimum la începutul testului. În apendicele 1 se dau intervalele corespunzătoare pentru mărimea diferitelor specii recomandate în acest test. Pentru întregul lot de pești folosit, limitele greutăților corporale individuale la începutul testului sunt, în mod ideal, cuprinse în intervalul de ± 10 % din media aritmetică a greutăților și, în orice caz, trebuie să nu

depășească 25 %. Se recomandă cântărirea unui sub-eșantion de pești înainte de testare, pentru a estima greutatea medie.

Peștii nu trebuie hrăniți timp de 24 de ore înainte de începerea testului. Apoi sunt aleși la întâmplare. Folosind un anestezic general [de exemplu, o soluție apoasă de 100 mg/l de metansulfonat de tricaină (MS 222) neutralizată prin adăugarea a două părți bicarbonat de sodiu la o parte de MS 222], peștii sunt cântăriți individual ca greutate *in vivo* zvântați, la precizia indicată în apendicele 1. Se reține peștii a căror greutate se află în intervalul dorit și apoi sunt distribuiți aleator în bazine. Trebuie înregistrată greutatea totală a peștilor din fiecare bazin. Folosirea anesteziculuiu, precum și manipularea peștilor (inclusiv zvântarea și cântărirea) pot să streseze și să rănească puietul, în special pe cel din speciile de talie mică. Prin urmare, manipularea puietului trebuie făcută cu cea mai mare grijă pentru a evita stresarea și rănirea animalelor de experiență.

Peștii sunt cântăriți din nou în a 28-a zi a testului (a se vedea punctul 1.8.6). Cu toate acestea, dacă se consideră necesar să fie recalculată rația alimentară, peștii pot fi cântăriți din nou în ziua a 14-a a testului (a se vedea punctul 1.8.2.3). Altă metodă, cum ar fi metoda fotografică, poate fi folosită pentru a determina schimbările în dimensiunile peștilor pe baza cărora se pot ajusta rațiile alimentare.

1.8.2. **Condițiile de expunere**

1.8.2.1. *Durata*

Durata testului este de 28 de zile.

1.8.2.2. *Rata de încărcare și densitatea populației*

Este important ca rata de încărcare și densitatea populației să fie adecvate pentru specia folosită (a se vedea apendicele 1). Dacă densitatea populației este prea mare, apare stresul de supraaglomerație, conducând la reducerea ratei de creștere și, posibil, la boli. Dacă densitatea este prea mică, poate apărea un comportament teritorial care de asemenea să afecteze creșterea. În orice caz, rata de încărcare trebuie să fie suficient de redusă pentru ca o concentrație de oxigen dizolvat de cel puțin 60 % VSA să poată fi menținută fără aerare. Un test de intercalibrare (3) a arătat că, pentru păstrăvul-curcubeu, o rată de încărcare de 16 păstrăvi de 3-5 g într-un volum de 40 l este acceptabilă. Frecvența recomandată de schimbare a apei pe durata testului este de 6 l/g de pește/zi.

1.8.2.3. *Hrănirea*

Peștelui i se administrează o alimentație corespunzătoare (apendicele 1) într-o cantitate suficientă pentru a induce o rată de creștere acceptabilă. Se veghează la evitarea proliferării microbilor și a turbidității apei. Pentru păstrăvul-curcubeu, o rație zilnică reprezentând 4 % din greutatea corporală satisface aceste condiții (3) (16) (17) (18). Rația zilnică poate fi împărțită în două porții egale și dată în două etape, la interval de cel puțin 5 ore. Rația se calculează pornind de la greutatea totală a peștilor din fiecare bazin. Dacă peștii sunt cântăriți din nou în ziua a 14-a, rația se recalculează în acea zi. Peștii nu sunt hrăniți timp de 24 de ore înainte de cântărire.

Alimentele neconsumate și materiile fecale trebuie îndepărtate zilnic din bazine, prin curățarea atentă a fundului fiecărui bazin folosind o țeavă aspiratoare.

1.8.2.4. *Lumina și temperatura*

Perioada în care bazinul este expus la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate speciei testate (apendicele 1).

1.8.3. **Concentrațiile de lucru**

În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței testate, indiferent de structurarea testului (a se vedea punctul 1.7.2). Cunoașterea prealabilă a toxicității substanței testate (de exemplu, dintr-un test de toxicitate acută și din studii de determinare a intervalelor) ajută la alegerea concentrațiilor adecvate. Trebuie justificată folosirea a mai puțin de cinci concentrații. Concentrația maximă testată nu trebuie să depășească limita de solubilitate a substanței în apă.

Când se folosește un agent de dispersie la prepararea soluției de bază, concentrația finală a acestuia nu trebuie să depășească 0,1 ml/l și este de preferat să fie aceeași în toate bazinele (a se vedea punctul 1.6.3). Recurgerea la astfel de produse trebuie totuși evitată pe cât posibil.

1.8.4. **Bazinele martor**

Numărul bazinelor martor cu apă de diluare depinde de structurarea testului (a se vedea punctele 1.7-1.7.2). Dacă se folosește agent de dispersie, trebuie cuprins în test și un număr de bazine martor cu agent de dispersie egal cu numărul bazinelor martor cu apă de diluare.

1.8.5. **Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice**

Pe durata testului concentrațiile substanței testate se determină cu regularitate (a se vedea în continuare).

La testele în regim dinamic, debitele diluantului și al soluției de bază conținând substanța toxică trebuie verificate cu regularitate, de preferință zilnic, și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului. Atunci când concentrațiile substanței testate se așteaptă să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (adică în intervalul 80-120 %; a se vedea punctele 1.6.2 și 1.6.3), se recomandă minimal analiza celei mai ridicate și a celei mai scăzute concentrații la începutul testului, iar apoi la intervale de o săptămână. În cazul testului la care concentrația substanței testate nu se așteaptă a rămâne în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (pe baza datelor de stabilitate privind substanța testată), este necesară analizarea tuturor concentrațiilor, dar urmând același procedeu.

La testele în regim semistatic (cu schimbarea apei) unde concentrația substanței testate este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală, se recomandă ca, minimal, concentrația cea mai ridicată și cea mai scăzută să fie analizate imediat după preparare și imediat înainte de schimbarea apei la începutul studiului și săptămânal după aceea. La testele unde concentrația substanței testate nu este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală, trebuie analizate toate concentrațiile urmând aceeași metodă ca și pentru substanțele mai stabile.

Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, atunci când, în mod demonstrabil, concentrația substanței testate în soluție a fost menținută pe parcursul întregului test în intervalul ± 20 % față de concentrația nominală sau concentrația măsurată inițial, rezultatele pot fi fundamentate pe valorile nominale sau măsurate.

Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm) sau centrifugarea lor. Centrifugarea este metoda recomandată. Cu toate acestea, dacă mediul de lucru nu se adsoarbe pe filtru, filtrarea este în egală măsură acceptabilă.

În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura se măsoară în toate bazinele. Duritatea totală, alcalinitatea și salinitatea se măsoară (dacă are relevanță) în bazinele martor și în bazinul cu cea mai ridicată concentrație. Minimal, oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară de trei ori (la început, la jumătate și la sfârșitul testului). În testele în regim semistatic, se recomandă ca oxigenul dizolvat să se măsoare mai frecvent, de preferință înainte și după schimbarea apei sau cel puțin o dată pe săptămână. pH-ul se măsoară la începutul și la sfârșitul fiecărei schimbări a apei la testele în regim semistatic și cel puțin săptămânal la testele în regim dinamic. Duritatea și alcalinitatea se măsoară o dată la fiecare test. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul din bazine.

1.8.6. **Observațiile**

Greutatea: la sfârșitul testului toți peștii supraviețuitori trebuie cântăriți *in vivo* zvântați (*blotted dry*), fie în grupuri pe fiecare bazin, fie individual. Cântărirea în grup este preferată cântăririlor individuale, care necesită marcarea individuală a peștilor. În cazul măsurării greutății individuale în scopul determinării ratei de creștere specifice individuale, tehnica de marcare aleasă trebuie să evite stresarea animalelor (se poate folosi o metodă diferită de metoda crio-marcajului, de exemplu un fir de undiță subțire, colorat).

Peștii sunt examinați zilnic pe durata testului și se observă orice anomalii exterioare (cum ar fi hemoragia, decolorarea) și comportamente anormale. Se înregistrează cazurile de deces și se îndepărtează peștii morți cât mai repede posibil. Peștii morți nu sunt înlocuiți, rata de încărcare și densitatea populației fiind suficiente pentru a evita efectele asupra creșterii provocate de schimbarea numărului de pești din bazin. Este necesar totuși să se ajusteze rația alimentară.

2. REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se recomandă implicarea unui statistician atât în structurarea cât și în analiza testului, deoarece această metodă de testare permite variații considerabile în modul de lucru, cum ar fi, de exemplu, variații în numărul de bazine, de concentrații folosite, de pești etc. Luând în considerare opțiunile disponibile în structurarea testului, nu sunt prezentate aici îndrumările specifice referitoare la metoda statistică.

Ratele de creștere nu se calculează pentru bazinele în care mortalitatea depășește 10 %. Cu toate acestea, rata mortalității trebuie indicată la toate concentrațiile folosite.

Oricare din metode este folosită la analizarea rezultatelor, conceptul central este rata r de creștere specifică între momentul t_1 și momentul t_2. Aceasta poate fi definită în câteva moduri, în funcție de prezența sau absența marcajului individual al peștilor sau în funcție de necesitatea aflării unei medii pe bazin.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

unde:

r_1 = rata de creștere specifică individuală

r_2 = rata de creștere specifică medie a bazinului

r_3 = rata de creștere pseudospecifică

w_1, w_2 = greutățile corporale ale unui anumit pește la momentele t_1 și respectiv t_2

$\log_e w_1$ = logaritmul greutății corporale a unui anumit pește la începutul perioadei de studiu

$\log_e w_2$ = logaritmul greutății corporale a unui anumit pește la sfârșitul perioadei de studiu

$\overline{\log_e w_1}$ = media logaritmilor valorilor w_1 pentru peștii din bazin la începutul perioadei de studiu

$\overline{\log_e w_2}$ = media logaritmilor valorilor w_2 pentru peștii din bazin la sfârșitul perioadei de studiu

t_1, t_2 = momente (zile) de la începutul și de la sfârșitul perioadei de studiu

r_1, r_2, r_3 pot fi calculate pentru perioada cuprinsă între ziua 0 și ziua 28 și acolo unde este cazul (adică atunci când s-a făcut o măsurătoare în ziua 14) pentru perioadele dintre ziua 0 și ziua 14 și ziua 14 și ziua 28.

2.1.1. **Analiza rezultatelor prin regresie (modelarea concentrație-răspuns)**

Această metodă de analiză stabilește o relație matematică adecvată între ratele de creștere specifice și concentrație, ceea ce permite estimarea mărimii „CE_x", adică orice valoare CE necesară. Folosind această metodă nu mai este necesar calculul mărimii r pentru fiecare pește (r_1) și în schimb analiza pornește de la valoarea medie pe bazin a lui r (r_2). Această ultimă metodă este preferabilă. În plus, este și mai adecvată în cazul speciilor de talie mică.

Pentru a studia relația concentrație-răspuns, ratele de creștere specifice medii ale bazinelor (r_2) se așează pe un grafic ca funcție de valorile concentrațiilor.

Pentru exprimarea relației dintre r_2 și concentrație trebuie ales modelul adecvat, iar alegerea trebuie susținută de o justificare pertinentă.

Dacă peștii supraviețuitori sunt în număr diferit de la un bazin la altul, atunci procesul de ajustare a modelului, fie acesta simplu sau nelinear, se ponderează pentru a lua în considerare mărimile diferite ale grupurilor.

Metoda de ajustare a modelului trebuie să facă posibilă estimarea, de exemplu, a valorii CE_{20} și a dispersiei sale (fie eroare standard, fie interval de încredere). Graficul modelului ajustat este prezentat în relație cu rezultatele, așa încât să poată fi apreciat gradul de adecvare a modelului (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Analiza rezultatelor pentru estimarea DMEO**

Dacă testul a cuprins bazine-dublură la toate nivelurile de concentrație, estimarea DMEO poate fi făcută pe baza analizei de varianță a ratei de creștere specifice medii a bazinului (a se vedea punctul 2.1), urmată de o metodă pertinentă [de exemplu, testul Dunnett sau testul William (13) (14) (15) (22)] de comparare a r medii corespunzătoare fiecărei concentrații cu r medie din bazinele martor, pentru a identifica valoarea cea mai scăzută a concentrației pentru care diferența este semnificativă la nivelul de probabilitate de 0,05. Dacă nu sunt îndeplinite condițiile impuse pentru metodele parametrice - distribuție nenormală (de exemplu, testul Shapiro-Wilk) sau varianță heterogenă (testul Barlett) - trebuie luată în considerare transformarea datelor, în scopul omogenizării varianțelor înainte de efectuarea analizei de varianță, sau efectuarea unei analize de varianță ponderate.

Dacă testul nu a cuprins bazine-dublură la fiecare concentrație, o analiză de varianță pe baza rezultatelor pe bazin va fi insensibilă sau imposibilă. În această situație, un compromis acceptabil este să se efectueze analiza pornind de la rata de creștere pseudospecifică r_3 pentru fiecare pește.

r_3 medie de la fiecare nivel de concentrație se compară cu r_3 medie din cazul bazinelor martor. DMEO poate fi identificată ca mai sus. Trebuie admis că această metodă nu ia în considerare variabilitatea între bazine în afară de ce se poate explica prin variabilitatea între pești, tratați individual, și nici nu oferă protecție în acest sens. Cu toate acestea, experiența a arătat (9) că variabilitatea între bazine a fost foarte mică în comparație cu variabilitatea în interiorul aceluiași bazin (adică între pești). Dacă analiza nu cuprinde fiecare pește, trebuie să se prezinte metoda de identificare a valorilor aberante și justificarea folosirii ei.

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanțelor toxice ajung la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice sau, la testele în regim semistatic, atunci când concentrația substanței testate scade între momentul preparării soluției și momentul schimbării apei.

2.3. RAPORTUL

Raportul testului trebuie să cuprindă următoarele informații:

2.3.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate, după caz.

2.3.2. **Specia testată**

— numele științific, dacă este posibil;

— sușa, mărimea, furnizorul, eventuale tratamente prealabile etc.

2.3.3. **Condițiile de lucru:**

— metoda folosită (de exemplu, regim semistatic/schimbarea apei, regim dinamic, încărcare, densitatea populației etc.);

— structurarea testului (de exemplu, număr de bazine, concentrații folosite și dubluri, număr de pești pe bazin);

— metoda de preparare a soluțiilor de bază și frecvența schimbării apei (se specifică agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— concentrațiile nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile lor standard în bazine și metoda prin care au fost obținute, precum și date care să demonstreze că măsurătorile se referă la concentrația substanței testate în soluția reală;

— caracteristicile apei de diluare: pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă se măsoară), carbon organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului de lucru (dacă se măsoară) și orice alte măsurători efectuate;

— calitatea apei din bazine: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații detaliate despre alimentație [de exemplu, tipul alimentului (alimentelor), sursa, cantitatea administrată și frecvența].

2.3.4. **Rezultatele**

— date demonstrând că loturile din bazinele martor au îndeplinit criteriile de validitate referitoare la supraviețuire și date privind mortalitatea de la fiecare nivel de concentrație;

— tehnicile de analiză statistică folosite, statistici întemeiate pe bazine-dublură sau pe fiecare pește, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor folosite;

— date tabelare privind greutățile corporale individuale și medii din zilele 0, 14 (dacă se măsoară) și 28, valorile ratelor de creștere specifice medii ale bazinelor sau pseudospecifice (după caz) pentru perioadele dintre ziua 0 și ziua 28 sau, posibil, ziua 0 și ziua 14 și dintre ziua 14 și ziua 28;

— rezultatele analizei statistice (adică analiza prin regresie sau de varianță), de preferat în formă tabelară și grafică și DMEO (p = 0,05) și DFEO sau Cex cu erori standard când este posibil, după caz;

— incidența oricăror reacții neobișnuite a peștilor și orice efecte vizibile provocate de substanța testată.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 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. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and 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.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate 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. and Höfte 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, Japan.

(7) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and 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 and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 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 1/RM/28, 81 pp.

(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 December 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.

(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 N. T. (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, pp. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 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, New Jersey, USA. 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, 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, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. 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.

APENDICELE 1

SPECIILE DE PEȘTI RECOMANDATE PENTRU TESTARE ȘI CONDIȚIILE DE LUCRU ADECVATE

Specia	Intervalul de temperatură recomandat (°C)	Perioada de expunere la lumină (ore)	Intervalul recomandat pentru greutatea inițială a peștilor (g)	Precizia obligatorie a măsurătorilor	Rata de încărcare (g/l)	Densitatea populației (pe litru)	Alimentația	Durata testului (zile)
Specii recomandate								
Oncorhynchus mykiss păstrăv-curcubeu	12,5-16,0	12-16	1-5	până la 100 mg	1,2-2,0	4	Hrană uscată din larve salmonide (produsă sub licență)	≥ 28
Alte specii bine studiate:								
Danio rerio Peștele-zebră	21-25	12-16	0,050-0,100	până la 1 mg	0,2-1,0	5-10	Hrană vie *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Medaka	21-25	12-16	0,050-0,100	până la 1 mg	0,2-1,0	5-20	Hrană vie *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

APENDICELE 2

UNELE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUARE ACCEPTABILE

Substanța	Concentrațiile
materie în particule	< 20 mg/l
carbon organic total	< 2 mg/l
amoniac neionizat	< 1 µg/l
clor rezidual	< 10 µg/l
pesticide organofosforice totale	< 50 ng/l
pesticide organoclorice totale plus bifenili policlorinați	< 50 ng/l
clor organic total	< 25 ng/l

APENDICELE 3

SERIILE LOGARITMICE ALE CONCENTRAȚIILOR ADECVATE PENTRU TESTUL DE TOXICITATE (9)

Coloană (număr de concentrații între 100 și 10 sau între 10 și 1) (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

(1) Dintr-o coloană poate fi aleasă o serie de cinci (sau mai multe) concentrații. Punctele de mijloc dintre concentrațiile din coloana (x) se găsesc în coloana (2x + 1). Valorile enumerate pot să reprezinte concentrații exprimate ca procente greutate pe unitatea de volum (mg/l sau µg/l). Valorile pot fi înmulțite sau împărțite cu orice putere a lui 10, după caz. Coloana 1 poate fi folosită dacă există o incertitudine semnificativă asupra nivelului de toxicitate.

C.15. PEȘTII, TESTUL DE TOXICITATE PE TERMEN SCURT ÎN STADIILE DE EMBRION ȘI DE ALEVIN

1. METODA

Această metodă de testare a toxicității pe termen scurt reproduce Orientarea 212 a OCDE (1998).

1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate pe termen scurt în stadiile de embrion și de alevin ale peștilor este un test în care sunt expuse toxicității stadiile de dezvoltare între începutul stadiului de ou fertilizat și sfârșitul stadiului de alevin. În acest test nu se administrează hrană și testul trebuie să se încheie când alevinii sunt încă hrăniți din sacul vitelin.

Testul urmărește să definească efectele letale și, în măsură limitată, efectele subletale ale produselor chimice asupra stadiilor de dezvoltare ale speciilor testate. Acest test furnizează informații utile, putând (a) să formeze o punte între testele letale și subletale, (b) să fie fi folosit ca test preliminar fie pentru un test de toxicitate complet în stadiile de viață timpurii, fie pentru testele de toxicitate cronică și (c) să fie folosit la testarea speciilor acolo unde tehnicile de creștere a animalelor de experiență nu sunt suficient de avansate pentru a acoperi perioada de trecere de la alimentația endogenă la cea exogenă.

Trebuie știut că numai testele care acoperă toate stadiile din ciclul de viață a peștelui sunt în general în măsură să prezinte o estimare corectă a toxicității cronice la pește a produselor chimice și orice expunere care omite vreunul din stadii poate reduce sensibilitatea și astfel poate subestima toxicitatea cronică. Prin urmare, este de așteptat ca testul pe embrioni și alevini să fie mai puțin sensibil decât un test complet în stadiile de viață timpurii, în special în privința produselor chimice puternic lipofile (log P_{ow} > 4) și a celor având un mod specific de acțiune toxică. Cu toate acestea, este de așteptat ca diferențele de sensibilitate între cele două teste să fie mai mici în cazul produselor cu mod de acțiune nespecific, narcotic (1).

Înainte de publicarea acestui test, cea mai mare parte a experienței legate de testul pe embrioni și alevini s-a obținut cu peștii de râu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae - nume popular peștele-zebră). Mai multe îndrumări detaliate asupra modului de lucru în cazul acestei specii sunt prezentate în apendicele 1. Aceasta nu exclude folosirea altor specii în cazul cărora există experiență acumulată (tabelele IA și IB).

1.2. DEFINIȚII

Concentrația minimă cu efect observabil (CMEO): este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect semnificativ (la $p < 0,05$) în comparație cu lotul martor. Cu toate acestea, toate concentrațiile mai mari decât CMEO trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la CMEO.

Concentrația fără efecte observabile (CFEO): este concentrația testată imediat sub valoarea CMEO.

1.3. PRINCIPIUL METODEI

Embrionii și alevinii sunt expuși la o serie de concentrații ale substanței testate dizolvate în apă. Protocolul de testare permite alegerea între regimul semistatic și cel dinamic. Alegerea depinde de natura substanței testate. Testul începe prin așezarea ouălor fertilizate în incintele experimentale și se încheie imediat înainte ca sacul vitelin al fiecărei larve din fiecare incintă să fi fost complet absorbit sau înainte de a apărea moartea prin inaniție la loturile martor. Efectele letale și subletale sunt evaluate și comparate cu valorile din loturile martor, pentru a determina concentrația minimă cu efect observabil și, de aici, concentrația fără efect observabil. O altă metodă este analiza folosind un model de regresie în scopul de a estima concentrația care ar provoca o variație procentuală dată (adică CL/CE_x, unde x este definit ca % variație).

1.4. INFORMAȚII DESPRE SUBSTANȚA TESTATĂ

Ar trebui să fie disponibile rezultatele testului de toxicitate acută (a se vedea metoda C.1), de preferință efectuat pe specii alese pentru prezentul test. Rezultatele pot fi utile în alegerea intervalului adecvat de concentrații de lucru la testul în stadiile de viață timpurii. Ar trebui cunoscute solubilitatea în apă (inclusiv solubilitatea în apa folosită la test) și presiunea vaporilor substanței testate. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței în soluții testate, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute și menționate în raport.

Informațiile asupra substanței testate care sunt utile în fixarea condițiilor de lucru cuprind: formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului, pKa, P_{ow} și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă (a se vedea metoda de testare C.4).

1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca testul să fie valid, trebuie îndeplinite următoarele condiții:

— supraviețuirea globală a ouălor fertilizate în loturile martor si, unde este cazul, în incintele conținând solvent, dar fără substanță testată, trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în apendicele 2 și 3,

— concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie între 60 % și 100 % din valoarea de saturație în aer (VSA), pe toată durata testului,

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,5 °C între incintele experimentale sau între zile succesive în orice moment al testului și trebuie să fie în intervalele de temperatură specificate pentru specia testată (apendicele 2 și 3).

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Incintele experimentale**

Pot fi folosite orice recipiente de sticlă sau din alt material chimic inert. Dimensiunile recipientelor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite respectarea ratei de încărcare (a se vedea punctele 1.7.1.2). Se recomandă poziționarea aleatoare a incintelor în laborator. La dispunerea incintelor, o schemă de randomizare a blocurilor de incinte, fiecare tratament fiind reprezentat în fiecare bloc, este preferabilă unei scheme de randomizare integrală a incintelor, dacă în laborator există efecte sistematice care pot fi controlate folosind gruparea incintelor. Gruparea în blocuri, dacă se folosește, trebuie să fie luată în considerare în analiza ulterioară a rezultatelor. Incintele experimentale trebuie protejate de orice perturbare nedorită.

1.6.2. **Alegerea speciilor de pești**

Speciile de pești recomandate sunt prezentate în tabelul 1A. Aceasta nu exclude folosirea altor specii (exemple sunt prezentate în tabelul 1B), dar modul de lucru trebuie adaptat pentru a asigura condiții corespunzătoare. În acest caz, justificarea alegerii speciei și a metodei experimentale trebuie specificată în raport.

1.6.3. **Îngrijirea peștilor reproducători**

Detalii despre îngrijirea populației de pești reproducători în condiții satisfăcătoare se găsesc în Linia directoare 210 a OCDE ([1]) și în referințele bibliografice (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. **Manipularea embrionilor și larvelor**

Embrionii și larvele pot fi puse, în interiorul cuvei principale, în recipiente mai mici, cu laturile sau extremitățile din plasă, pentru a permite curgerea soluției prin recipient. Curgerea neturbulentă prin aceste recipiente mici poate fi indusă prin atașarea lor la un braț mobil, care deplasează vertical recipientele, dar așa încât să mențină organismele imersate; se poate folosi de asemenea un sistem sifon. Ouăle fertilizate de salmonide pot fi puse pe suporturi sau site cu ochiul suficient de mare pentru a permite larvelor să traverseze după eclozare. Folosirea pipetelor Pasteur este oportună pentru îndepărtarea embrionilor și a larvelor în testele semistatice cu schimbarea zilnică și completă a apei (a se vedea punctul 1.6.6).

Când au fost folosite recipiente, site sau plase pentru a păstra ouăle în cuva principală, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor ([1]), cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica peștii să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer și nu trebuie folosite minciocuri pentru a scoate peștii din recipientele conținând ouăle (aceste precauții nu sunt necesare în cazul speciilor mai puțin fragile, cum este crapul). Momentul transferului variază în funcție de specie și transferul nu este întotdeauna necesar. În regim semistatic se pot folosi pahare de laborator sau vase cu înălțimea redusă și, dacă este necesar, echipate cu o sită la mică distanță de fundul paharului. Dacă volumul acestor recipiente este suficient pentru a respecta cerințele de încărcare (a se vedea 1.7.1.2) nu este necesar transferul embrionilor și larvelor.

([1]) OECD, Paris, 1992, Orientarea 210, Peștele, Teste de toxicitate în stadiile de viață timpurii.

1.6.5. **Apa**

Este corespunzătoare pentru test orice apă care respectă caracteristicile chimice ale unei ape de diluare enumerate în apendicele 4 și în care supraviețuirea loturilor martor din specia testată este cel puțin la fel de bună ca aceea prezentată în apendicele 2 și 3. Apa trebuie să își mențină calitatea constantă pe durata testului. pH-ul trebuie să rămână în intervalul de ± 0,5 unități. Pentru ca apa de diluare să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin complexare cu substanța testată) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie luate probe la intervale egale pentru analiză. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluare, se măsoară, de exemplu, la interval de trei luni conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca, Mg, Na, K, Cl și SO_4), pesticide (de exemplu, pesticide organofosforice totale și pesticide organoclorice totale), carbon organic total, solide în suspensie. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe o perioadă de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu, la fiecare șase luni).

1.6.6. **Soluțiile de lucru**

Soluțiile de lucru de concentrații date se prepară prin diluarea unei soluții de bază.

Soluția de bază se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței testate în apa de diluare, folosind mijloace mecanice (de exemplu, cu agitator sau ultrasunete). Pentru obținerea unei soluții de bază cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate). Folosirea solvenților sau a agenților de dispersie trebuie evitată pe cât posibil; totuși, în unele cazuri, astfel de compuși pot fi necesari pentru a produce o soluție de bază cu o concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilsulfoxidul, dimetilformamida și trietilenglicolul. Exemple de agenți de dispersie adecvați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Folosirea compușilor ușor biodegradabili (de exemplu acetona) și a compușilor foarte volatili trebuie să se facă atent, deoarece aceștia pot antrena proliferarea bacteriană în testele cu regim dinamic. Când se folosește un agent de dispersie, acesta trebuie, în demonstrația pe un lot martor tratat numai cu solventul, să nu provoace efecte semnificative asupra supraviețuirii și nici efecte adverse vizibile asupra stadiilor de viață timpurii.

La testele în regim semistatic, pot fi adoptate două moduri de lucru diferite: fie (i) se prepară soluții de lucru noi în recipiente curate, iar ouăle și larvele sunt transferate cu grijă în noile recipiente, într-un volum mic din vechea soluție evitând expunerea la aer fie (ii) organismele sunt păstrate în recipientele inițiale în timp ce o fracțiune (cel puțin trei sferturi) din apa de testare este schimbată. Frecvența schimbării apei depinde de stabilitatea substanței testate, dar se recomandă schimbarea zilnică. Dacă testele de stabilitate preliminare (a se vedea punctul 1.4) arată o instabilitate a concentrației substanței testate (adică în afara intervalului de 80-120 % din concentrația nominală sau sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe parcursul schimbării apei, trebuie luată în considerare folosirea unui test în regim dinamic. În oricare dintre cazuri, trebuie evitată stresarea larvelor în timpul operațiunii de schimbare a apei.

La testele în regim dinamic este necesar un sistem care să dozeze și să dilueze continuu soluția de bază a substanței testate (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura seria concentrațiilor din incintele experimentale. Debitele soluțiilor de bază și ale apei de diluare trebuie verificate la intervale definite, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin cinci volume de incintă în 24 de ore s-a dovedit adecvat (2).

1.7. MODUL DE LUCRU

Informații utile despre desfășurarea testelor pe embrioni de pește și alevini sunt disponibile în literatură, unele exemple fiind incluse în referințele bibliografice din prezentul text (7) (8) (9).

1.7.1. **Condițiile de expunere**

1.7.1.1. *Durata*

Testul este recomandabil să înceapă în următoarele 30 de minute după fertilizarea ouălor. Embrionii sunt imersați în soluția testată înainte sau cât de curând după începerea fazei de segmentare a blastodiscului și în orice caz înainte de debutul fazei de gastrulă. În cazul ouălor obținute de la furnizori comerciali, s-ar putea să nu fie posibilă începerea testului imediat după fertilizare. Deoarece amânarea începerii testului poate influența puternic sensibilitatea acestuia, testul trebuie inițiat în următoarele opt ore după fertilizare. Deoarece larvele nu sunt hrănite pe durata expunerii, testul trebuie să se încheie imediat înainte ca sacul

vitelin al fiecărei larve din fiecare incintă să fi fost complet absorbit sau înainte de a apărea moartea prin inaniție la loturile martor. Durata depinde de specia folosită. Câteva durate recomandate sunt prezentate în apendicele 2 și 3.

1.7.1.2. *Încărcarea*

Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie suficient pentru a îndeplini condițiile statistice. Ele trebuie distribuite aleator între tratamente și trebuie folosite la fiecare concentrație cel puțin 30 de ouă, împărțite în loturi egale (sau cât mai uniforme numeric, deoarece poate fi dificil să se obțină loturi egale când se folosesc unele specii) în cel puțin trei incinte identice. Rata de încărcare (biomasă pe volum de soluție de lucru) trebuie să fie suficient de scăzută pentru ca o concentrație a oxigenului dizolvat de minimum 60 % VSA să se poată menține fără aerare. La testele în regim dinamic a fost recomandată (2) o rată de încărcare nedepășind 0,5 g/l în 24 de ore și nedepășind 5 g/l de soluție în orice moment.

1.7.1.3. *Lumina și temperatura*

Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2 și 3). În scopul monitorizării temperaturii, poate fi adecvată folosirea unui recipient martor suplimentar.

1.7.2. **Concentrațiile de lucru**

În mod normal, sunt necesare cinci valori de concentrații ale substanței testate, aflate în progresie geometrică cu o rație care să nu depășească 3,2. La alegerea intervalului de concentrații trebuie luată în considerare curba reprezentând CL_{50} în funcție de expunere, rezultată din studiul de toxicitate acută. Folosirea a mai puțin de cinci concentrații, de exemplu, în testele la valori limită, și un interval mai îngust se pot dovedi adecvate în unele cazuri. Trebuie justificată folosirea a mai puțin de cinci concentrații. Nu este necesară testarea concentrațiilor mai ridicate fie de CL_{50} la 96 de ore, fie mai ridicate de 100 mg/l (care valoare este mai scăzută dintre acestea) Concentrația maximă testată nu trebuie să depășească limita de solubilitate a substanței în apă.

Când se folosește un agent de dispersie la prepararea soluțiilor (vezi punctul 1.6.6), concentrația finală a acestuia în recipiente trebuie să nu depășească 0,1 ml/l și este de preferat să fie aceeași în toate recipientele.

1.7.3. **Loturile martor**

În paralel cu loturile tratate trebuie să fie studiate și loturile dintr-o incintă cu apă de diluare (cu dublură, dacă este cazul) și, dacă prezintă relevanță, dintr-o incintă cu agent de dispersie (cu dublură, dacă este cazul).

1.7.4. **Frecvența măsurătorilor și a determinărilor analitice**

Pe durata testului concentrațiile substanței testate se determină cu regularitate.

La testele în regim semistatic în care concentrația substanței testate este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (adică în intervalul 80–120 %; a se vedea punctele 1.4 și 1.6.6), se recomandă ca, minimal, concentrația cea mai ridicată și cea mai scăzută să fie analizate imediat după preparare și la schimbarea apei de cel puțin trei ori, la intervale egale pe durata testului (adică analizele trebuie efectuate pe o probă din aceeași soluție, o dată când este proaspăt preparată și o dată înainte de schimbarea apei).

La testele în care concentrațiile nu este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (pe baza datelor referitoare la stabilitatea substanței), trebuie analizate toate concentrațiile imediat după preparare și imediat înainte de schimbarea apei, dar urmând aceeași metodă (adică de cel puțin trei ori la intervale egale pe durata testului. Determinarea concentrațiilor substanței testate înainte de schimbarea apei este suficient să fie făcută numai la un singur recipient la fiecare concentrație. Determinările trebuie să nu fie făcute la intervale mai lungi de șapte zile. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, atunci când, în mod demonstrabil, concentrația substanței testate în soluție a fost menținută pe parcursul întregului test în intervalul ± 20 % față de concentrația nominală sau concentrația măsurată inițial, rezultatele pot fi fundamentate pe valorile nominale sau măsurate inițial.

La testele în regim dinamic este adecvat un sistem de prelevare a probelor similar cu acela prescris pentru regimul semistatic (dar măsurarea soluțiilor „vechi" nu se aplică în acest caz). Cu toate acestea, dacă durata testului este mai mare de șapte zile, este recomandabilă creșterea numărului de prelevări în prima săptămână (de exemplu, trei seturi de măsurători) pentru a se asigura stabilitatea concentrațiilor.

Se poate dovedi necesară centrifugarea probelor sau filtrarea lor (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm). Cu toate acestea, deoarece se pare că nici centrifugarea nici filtrarea nu separă întotdeauna fracția non-biodisponibilă a substanței testate de fracțiunea biodisponibilă, se poate dovedi inutilă supunerea probelor la aceste tratamente.

În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura se măsoară în toate bazinele. Duritatea totală, și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară în incintele martor și în incinta cu cea mai ridicată concentrație. Minimal, oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară de trei ori (la începutul, la jumătatea și la sfârșitul testului). În testele în regim semistatic, se recomandă ca oxigenul dizolvat să se măsoare mai frecvent, de preferință înainte și după schimbarea apei sau cel puțin o dată pe săptămână. pH-ul trebuie măsurat la începutul și la sfârșitul fiecărei schimbări a apei la testele în regim semistatic și cel puțin săptămânal la testele în regim dinamic. Duritatea trebuie măsurată o dată la fiecare test. Temperatura se măsoară zilnic și este de preferat să fie monitorizată continuu cel puțin într-una din incinte.

1.7.5. **Observațiile**

1.7.5.1. *Stadiul dezvoltării embrionare*

Stadiul embrionar (adică stadiul de gastrulă) la începutul expunerii la substanța testată trebuie verificat cât mai exact posibil. Aceasta se poate face folosind un eșantion reprezentativ de ouă păstrate corespunzător și curățate până devin translucide. Pentru descrierea și ilustrarea stadiilor embrionare se poate consulta și literatura (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Eclozarea și supraviețuirea*

Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să fie făcute cel puțin o dată pe zi și numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. La începutul testului este de dorit ca observațiile să fie mai frecvente (de exemplu, la fiecare 30 de minute în primele trei ore), deoarece în unele cazuri timpul de supraviețuire este mai relevant decât numărul deceselor (de exemplu, când există efecte toxice acute). Embrionii și larvele moarte trebuie îndepărtate imediat ce sunt observate, fiindcă se pot descompune rapid. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu răni sau leza ouăle/larvele din vecinătate,acestea fiind extrem de delicate și de sensibile. Simptomele care indică moartea organismului variază în funcție de stadiul de viață:

— **pentru ouă:** în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a transluciditățiii și schimbarea coloraței, provocată de coagularea și precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;

— **pentru embrioni:** absența mișcărilor corpului și absența bătăilor inimii și decolorarea opacă la speciile ai căror embrioni sunt în mod normal translucizi;

— **pentru larve:** imobilitatea și absența mișcărilor respiratorii și absența bătăilor inimii și coloraţia alb-opacă a sistemului nervos central și absența reacției la stimuli mecanici.

1.7.5.3. *Aspectul anormal*

Numărul larvelor prezentând anomalii ale formei corpului și pigmentare, precum și stadiul absorbției sacului vitelin trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului și de natura anomaliei în cauză. Trebuie spus că embrioni și larve anormale apar în mod natural și numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile martor ale unor specii. Animalele anormale nu trebuie îndepărtate din recipiente decât atunci când mor.

1.7.5.4. *Comportamentul anormal*

Anomaliile, de exemplu, hiperventilarea, înotul necoordonat și imobilitatea neobișnuită, trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului. Aceste efecte, deși dificil de cuantificat, pot, atunci când sunt ținute sub observație, să ajute la interpretarea datelor privind mortalitatea, adică pot furniza informații despre modul de acțiune toxică a substanței.

1.7.5.5. *Lungimea*

La sfârșitul testului se recomandă măsurarea lungimilor individuale; poate fi folosită oricare din lungimile standard, până la scobitura caudală sau totală. Cu toate acestea, dacă se constată o putrefacție sau o rosătură la înotătoarea caudală, se folosesc lungimile standard. În general, într-un test efectuat corect, coeficientul de variație a lungimii în lotul martor este ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Greutatea*

La încheierea testului poate fi măsurată greutatea corporală individuală; greutatea organismului uscat (24 de ore la 60 °C) este preferată greutății *in vivo* (pește zvântat). În general, într-un test efectuat corect, coeficientul de variație a lungimii în lotul martor este ≤ 20 %.

Aceste observații pun la dispoziția analizei statistice totalitatea datelor următoare sau unele dintre acestea:

— mortalitatea cumulată;

— numărul larvelor sănătoase la încheierea testului;

— momentele de început și sfârșit al eclozării (adică 90 % ouă eclozate în fiecare incintă de la același nivel al concentrației);

— numărul larvelor eclozate în fiecare zi;

— lungimea (și greutatea) animalelor supraviețuitoare la încheierea testului;

— numărul larvelor cu diformități sau cu aspect anormal;

— numărul larvelor prezentând comportament anormal.

2. REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se recomandă implicarea unui statistician atât în structurarea cât și în analiza testului, deoarece această metodă de testare permite variații considerabile în modul de lucru, cum ar fi, de exemplu, variații în numărul de incinte experimentale și de concentrații folosite, în numărul inițial de ouă fertilizate și în parametrii măsurați. Luând în considerare opțiunile disponibile în structurarea testului, nu sunt prezentate aici îndrumările specifice referitoare la metoda statistică.

Dacă urmează să fie estimate DMEO/DFEO, este necesar ca variațiile să fie estimate în cadrul fiecărui set de incinte de la aceeași concentrație, folosind analiza de variație sau metodele tabelelor de contingență. Metoda Dunnett se poate dovedi folositoare (12) (13). pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și rezultatele obținute în legătură cu loturile martor. De asemenea sunt disponibile și alte exemple utile (14) (15). Mărimea efectului detectabil folosind analiza de varianță sau alte metode (adică puterea testului) trebuie calculată și menționată în raport. Trebuie spus că nu toate observațiile enumerate la punctul 1.7.5.6 sunt adecvate pentru analiza statistică de varianță. De exemplu, mortalitatea cumulată și numărul larvelor sănătoase la încheierea testului pot fi analizate folosind metode probit.

Dacă urmează să fie estimate CL/CE_x, una sau mai multe curbe, cum ar fi curba logistică, trebuie ajustate la datele studiate folosind o metodă precum metoda celor mai mici pătrate sau metoda celor mai mici pătrate neliniare. Curba (curbele) trebuie parametrizate astfel încât CL/CE_x studiate și eroarea standard respectivă să poată fi estimate direct. Aceasta va ușura mult calculul intervalului de încredere din jurul CL/CE_x. Dacă nu sunt motive întemeiate să fie preferate alte niveluri de încredere, ar trebui alese nivelurile de 95 % la ambele capete ale intervalului. Este de preferat ca metoda de ajustare să asigure un mijloc de a evalua semnificația neajustării. Pot fi folosite metode grafice de ajustare a curbelor. Analiza prin regresie este adecvată pentru toate observațiile enumerate la punctul 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanțelor toxice ajung la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice. Rezultatele se interpretează de asemenea cu precauție în cazul concentrațiilor mai mari decât solubilitatea în apă a substanței.

2.3. RAPORTUL

Raportul testului trebuie să cuprindă următoarele informații:

2.3.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței, după caz.

2.3.2. **Specia testată:**

— numele științific, susa numărul peștilor parentali (câte femele au fost folosite pentru a asigura numărul necesar de ouă), sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

2.3.3. **Condițiile de lucru:**

— metoda folosită (de exemplu, regim semistatic, regim dinamic, timpul scurs de la fertilizare până la începerea testului, încărcare etc.);

— perioada(perioadele) de expunere la lumină;

— structurarea testului (de exemplu, număr de incinte și de dubluri, număr de embrioni pe incintă);

— metoda de preparare a soluțiilor de bază și frecvența schimbării apei (trebuie specificat agentul de solubilizare și concentrația acestuia, dacă se folosește);

— concentrațiile de lucru nominale, valorile măsurate, mediile lor și deviațiile lor standard în recipiente și metoda prin care au fost obținute, precum și, dacă substanța testată este solubilă în apă la concentrații mai reduse decât cele testate, date care să demonstreze că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței testate în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluare: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă se măsoară), carbon organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului de lucru (dacă se măsoară) și orice alte măsurători efectuate;

— calitatea apei din recipiente: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat.

2.3.4. **Rezultatele:**

— rezultatele oricăror studii preliminare referitoare la stabilitatea substanței testate;

— date demonstrând că loturile din incintele martor au îndeplinit standardul de supraviețuire globală acceptabilă al speciei testate (apendicele 2 și 3);

— rezultate despre mortalitate/supraviețuire în stadiile de embrion și larvă și mortalitatea/supraviețuirea globală;

— zilele de eclozare și numărul eclozărilor;

— lungimea (și greutatea) corporală;

— incidența și descrierea anomaliilor morfologice, dacă există;

— incidența și descrierea efectelor comportamentale, dacă există;

— analiza statistică și prelucrarea datelor;

— la testele analizate folosind analiza de varianță, concentrația minimă cu efecte observabile (DMEO) la $p = 0,05$ și concentrația fără efecte observabile (DFEO) pentru fiecare răspuns evaluat, inclusiv descrierea metodelor statistice folosite și indicarea mărimii efectului care poate fi detectat;

— la testele analizate folosind analiza prin regresie, CL/CE_x și intervalele de încredere, precum și un grafic al modelului ajustat folosit în calcule;

— explicații pentru orice abatere de la această metodă de testare.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(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, 60 pp. June 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. and 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. and 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, pp. 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. and 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. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining 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. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 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, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and 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 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and 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, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). 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: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 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, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and 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, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 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 and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

TABELUL 1A: Specii de pești recomandate pentru testare

Apă dulce
Oncorhyncus mykiss Păstrăv-curcubeu (9) (16)
Danio rerio Peștele-zebră (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Crap (8) (19)
Oryzias latipes Medaka (20) (21)
Pimephales promelas (8) (22)

TABELUL 1B: Exemple de alte specii de pești bine studiate care au fost folosite

Apă dulce	Apă sărată
Carassius auratus Caras auriu (8)	*Menidia peninsulae* (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus (8)	*Clupea harengus* Hering (24) (25)
	Gadus morhua Cod (24) (25)
	Cyprinodon variegatus (23) (24) (25)

APENDICELE I

GHID PENTRU EFECTUAREA UNUI TEST DE TOXICITATE LA EMBRIONI ŞI ALEVINI DE PEŞTE-ZEBRĂ (*BRACHYDANIO RERIO*)

INTRODUCERE

Peștele-zebră provine de pe coasta Coromandel din India unde trăiește în apele repezi. Este un pește obișnuit de acvariu din familia crapului și datele referitoare la creșterea și îngrijirea acestuia se pot găsi în cărțile de specialitate privind peștii tropicali. Laale descrie biologia și utilizarea acestuia în studiul privind peștii (1).

Acest pește are rareori o lungime mai mare de 45 cm. Corpul este cilindric cu 7-9 dungi argintii orizontale de culoare albastru închis. Aceste dungi ajung până la înotătoarele caudale și anale. Spatele este de culoare verde-măsliniu. Masculii sunt mai subțiri decât femelele. Femelele sunt mai argintii și abdomenul este umflat, în special înainte de depunerea icrelor.

Peștii adulți pot să suporte fluctuații mari de temperatură, pH și duritate a apei. Cu toate acestea, pentru a obține pești sănătoși care să producă icre de bună calitate, trebuie asigurate condiții optime.

În timpul depunerii icrelor, masculii urmăresc și lovesc cu capul femelele și astfel se produce fecundarea icrelor atunci când sunt expulzate. Icrele, care sunt transparente și nelipicioase, cad la fund unde pot fi mâncate de părinți. Depunerea icrelor este influențată de lumină. Dacă lumina dimineții este corespunzătoare, peștele depune icrele de obicei în primele ore din zori.

O femelă poate să producă loturi de câteva sute de icre săptămânal.

CONDIȚII PENTRU PEȘTII PĂRINȚI, REPRODUCERE ȘI PRIMELE STADII DE VIAȚĂ

Se selectează un număr potrivit de pești sănătoși care se păstrează în apă corespunzătoare (de exemplu, apendicele 4) cu cel puțin două săptămâni înainte de data preconizată pentru depunerea icrelor. Este necesar ca grupul de pești să fie lăsat să se reproducă cel puțin o dată înaintea producerii lotului de icre utilizate în test. Densitatea peștelui în perioada respectivă nu trebuie să depășească 1 gram de pește per litru. Schimbările regulate de apă sau utilizarea sistemelor de purificare permit o densitate mai mare. Temperatura din acvarii se menține la 25 ± 2 °C. Peștelui trebuie să i se asigure o alimentație variată, care poate să conțină, de exemplu hrana uscată specifică comercializată, Arthemia, chironomide, dafnia vii proaspăt ieșiți din ou, viermi albi (Enchytraeide).

În continuare, sunt prezentate două procedee, prin care s-a obținut în practică un lot suficient de icre fecundate, sănătoase pentru efectuarea unui test:

(i) 8 femele și 16 masculi se introduc într-un acvariu cu 50 litri apă de diluție, ecranat de lumina directă și se lasă cât se poate de liniștiți timp de 48 ore. La fundul vasului se așează o tavă pentru depunerea icrelor în după-amiaza zilei de dinaintea inițierii testului. Tava pentru depunerea icrelor este alcătuită dintr-un cadru (plexiglas sau alt material potrivit) înalt de 5-7 cm, prevăzut cu o plasă cu ochiuri mari, de 2-5 mm, fixată la partea superioară și o plasă fină, cu ochiuri de 10-30 µm, la partea inferioară. La plasele cu ochiuri mari ale cadrului, se atașează un număr de „pomi pentru depunerea icrelor" dintr-o frânghie de nylon nerăsucită. După ce peștii au fost lăsați în întuneric timp de 12 ore, se aprinde o lumină slabă care va iniția depunerea icrelor. La 2-4 ore după depunerea icrelor, se scoate tava pentru depunerea icrelor și se colectează icrele. Cu tava pentru depunerea icrelor se evită mâncarea icrelor de către pești și se facilitează colectarea icrelor. Este necesar ca grupul de pești să fi depus icre cel puțin o dată înaintea depunerii din care se iau icre pentru efectuarea testului.

(ii) Un număr de 5-10 masculi și femele se adăpostesc individual cu cel puțin două săptămâni înaintea depunerii icrelor. După 5-10 zile, abdomenele femelelor se umflă și papila genitală a acestora devine vizibilă. Masculii nu au papilă. Depunerea icrelor se realizează în acvarii de depunere a icrelor prevăzute cu un fund fals din plasă (cum s-a descris anterior). Acvariul este umplut cu apă de diluție, astfel încât, deasupra plasei apa să fie de 5-10 cm. O femelă și doi masculi se introduc în acvariu cu o zi înaintea datei preconizate pentru depunerea icrelor. Temperatura apei se crește treptat la o valoare cu un grad mai mare decât temperatura de aclimatizare. Se stinge lumina și acvariul se lasă cât se poate de liniștit. Dimineață, se aprinde o lumină slabă care va iniția depunerea icrelor. După 2-4 ore, peștele se scoate și se colectează icrele. Dacă sunt necesare loturi mai mari de icre decât se pot obține de la o femelă, se pot instala, în paralel, mai multe acvarii de depunere a icrelor. Prin înregistrarea rezultatului fiecărei femele înaintea testului (dimensiunea lotului și calitatea), se selectează pentru reproducere femelele cu cele mai bune rezultate la reproducere.

Este necesar ca icrele să fie transferate în vasele pentru efectuarea testului cu ajutorul unor tuburi de sticlă (diametrul interior de minimum 4 mm) prevăzute cu un bulb de aspirație flexibil. Cantitatea de apă care se transferă odată cu icrele trebuie să fie cât mai mică posibilă. Icrele sunt mai grele decât apa și ies pe la fundul tubului. Trebuie avut grijă pentru a preveni ca icrele (și larvele) să vină în contact cu aerul. Proba (Probele) din lot(uri) se examinează la microscop pentru a se asigura că nu există anomalii în primele etape de dezvoltare a embrionului. Nu este permisă dezinfecția icrelor.

Rata mortalității icrelor atinge apogeul în primele 24 de ore după fecundare. În această perioadă, se întâlnește adesea o mortalitate de 5-40 %. Icrele degenerează ca urmare a unei fecundări nereușite sau a dezvoltării insuficiente a embrionului. Calitatea lotului de icre se pare că depinde de peștele femelă, deoarece unele femele produc în mod constant icre de bună calitate, iar altele niciodată. De asemenea, rata de dezvoltare a embrionului și rata de ieșire din ou variază de la un lot la altul. Icrele fecundate cu succes și larvele din sacul vitelin supraviețuiesc bine, în mod normal peste 90 %. La 25 °C, ieșirea din ou se produce la 3-5 zile de la fertilizare și sacul vitelin se absoarbe în aproximativ 13 zile după fecundare.

Hisaoka și Battle au descris bine dezvoltarea embrionului (2). Datorită transparenței icrelor și larvelor după ieșirea din ou, se poate urmări dezvoltarea peștelui și este posibilă observarea malformațiilor. La aproximativ patru ore după depunerea icrelor, icrele nefecundate se pot distinge de cele fecundate (3). Pentru a efectua această examinare, icrele și larvele se așează pe vase de laborator de volum mic și se studiază la microscop.

Condițiile de desfășurare a testului, care se aplică în primele etape de viață, sunt prezentate în lista din apendicele 2. Valorile optime ale pH-ului și durității apei de diluție sunt 7, 8 și respectiv 250 mg $CaCO_3$/l.

CALCULE ȘI STATISTICĂ

Se propune un procedeu în două etape. Mai întâi, se analizează statistic datele privind mortalitatea, dezvoltarea anormală și momentul ieșirii din ou. Apoi, pentru acele concentrații la care nu s-au observat efecte negative asupra oricăruia din parametrii menționați, se evaluează statistic lungimea corpului. Această abordare este recomandabilă deoarece toxicul poate să ucidă selectiv peștii mai mici, să întârzie momentul ieșirii din ou și să inducă malformații majore, obținându-se astfel măsurători viciate ale lungimii. În plus, pentru fiecare tratament, va exista același număr de pești ce urmează să se măsoare, asigurându-se validitatea statisticii testului.

DETERMINAREA LC_{50} ȘI EC_{50}

Se calculează procentul de icre și larve supraviețuitoare și se corectează cu mortalitatea din probele martor conform formulei lui Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

unde,

P = supraviețuirea corectată, %

P′ = supraviețuirea observată la concentrațiile experimentate, %

C = supraviețuirea în cazul martorului

Dacă este posibil, LC_{50} se determină printr-o metodă corespunzătoare la sfârșitul testului.

Dacă se dorește introducerea anomaliilor morfologice în statistica CE_{50}, se poate folosi lucrarea lui Stephan (5) pentru orientare.

ESTIMAREA CMEO ȘI CFEO

Un obiectiv al testului efectuat pe icre și alevini este compararea concentrațiilor non-zero cu proba martor, adică determinarea CMEO. Pentru aceasta se utilizează multiple procedee de comparare (6) (7) (8) (9) (10).

BIBLIOGRAFIE

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(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, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and 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. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

APENDICELE 2

CONDIȚIILE, DURATA TESTULUI ȘI CRITERIILE DE SUPRAVIEȚUIRE PENTRU SPECIILE RECOMANDATE

Specia	Temperatura (°C)	Salinitatea (‰)	Perioada de expunere la lumină (ore)	Durata etapelor (zile)		Durata normală a testului	Supraviețuirea martorului (minimum %)	
				Embrion	Alevin		Reușita ieșirii din ou	După ieșirea din ou
APĂ DULCE								
Brachydanio rerio Peștele-zebră	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (8-10 zile)	80	90
Oncorhynchus mykiss Păstrăv-curcubeu	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	–	0 (3)	30-35	25-30	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 20 de zile după ieșirea din ou (50-55 zile)	66	70
Cyprinus carpio Crap	21-25	–	12-16	5	> 4	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (8-9 zile)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 24 ± 1 (2)	–	12-16	8-11	4-8	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (13-16 zile)	80	80
Pimephales promelas	25 ± 2	—	16	4-5	5	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (8-9 zile)	60	70

(1) Pentru embrioni.

(2) Pentru larve.

(3) Întuneric pentru embrioni și larve până la o săptămână după ieșirea din ou, cu excepția cazului în care se inspectează. Apoi se dă o lumină atenuată pe durata testului.

APENDICELE 3

CONDIȚIILE, DURATA TESTULUI ȘI CRITERIILE DE SUPRAVIEȚUIRE PENTRU ALTE SPECII BINE STUDIATE

Specii	Temperatura (°C)	Salinitatea (‰)	Perioada de expunere la lumină (ore)	Durata etapelor (zile)		Durata normală a testului	Supraviețuirea martorului (minimum %)	
				Embrion	Alevin		Reușita ieșirii din ou	După ieșirea din ou
APĂ DULCE								
Carassius auratus Caras auriu	24 ± 1	–	–	3-4	> 4	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (7 zile)	–	80
Leopomis macrochirus	21 ± 1	–	16	3	> 4	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 de zile după ieșirea din ou (7 zile)	–	75
APĂ SĂRATĂ								
Menidia peninsulae	22-25	15-22	12	1,5	10	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (6-7 zile)	80	60
Clupea harengus Hering	10 ± 1	8-15	12	22-25	3-5	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 3 zile după ieșirea din ou (23-27 de zile)	60	80
Gadus morhua Cod	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 3 zile după ieșirea din ou (18 zile)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15-30	12	–	–	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4/7 zile după ieșirea din ou (28 de zile)	> 75	80

APENDICELE 4

CÂTEVA CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUȚIE ADMISE

Substanța	Concentrațiile
Substanță impurificatoare	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clor rezidual	< 10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	< 50 ng/l
Totalul pesticidelor organoclorice și a bifenililor policloruraţi	< 50 ng/l
Clorul organic total	< 25 ng/l

C.16. ALBINELE - TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ

1. **METODA**

Metoda de determinare a toxicității acute reproduce Orientarea 213 a OCDE (1998).

1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate este o metodă de laborator, destinată determinării toxicității orale acute a produselor pentru protecția plantelor și a altor produse chimice la albinele lucrătoare adulte.

În aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor, ar putea fi necesară determinarea toxicității orale acute la albine, de exemplu când este posibilă expunerea albinelor la un anumit produs chimic. Testul de toxicitate orală acută se efectuează pentru determinarea toxicității inerente a pesticidelor și altor produse chimice la albine. Rezultatele testului respectiv trebuie utilizate pentru a stabili necesitatea unei evaluări suplimentare. Prezenta metodă se poate utiliza în special în programele în mai multe etape pentru evaluarea pericolelor pesticidelor pentru albine, prin înaintare secvențială de la testele de toxicitate de laborator la experimentările de semiteren și teren (1). Pesticidele se pot testa sub formă de substanțe active (s.a.) sau de preparate.

Pentru verificarea sensibilității albinelor și a preciziei metodei de testare este necesară utilizarea unui etalon de toxicitate.

1.2. DEFINIȚII

Toxicitatea orală acută: reprezintă efectele negative care apar în termen de maximum 96 ore (h) de la administrarea orală unei doze unice de substanță testată.

Doza: reprezintă cantitatea de substanță testată consumată. Doza se exprimă ca masa (μg) de substanță testată per animal experimental (μg/albină). Nu se poate calcula doza reală pentru fiecare albină, deoarece albinele sunt hrănite în colectiv, dar se poate estima o doză medie (substanța testată consumată în total/numărul de albine experimentale dintr-o cușcă).

DL_{50} (doza letală medie) orală: este o doză unică, obținută statistic, dintr-o substanță care poate provoca moartea a 50 % din animale atunci când se administrează pe cale orală. Valoarea DL_{50} se exprimă în (μg) de substanță testată per albină. Pentru pesticide, substanța testată poate să fie sub formă de substanță activă (s.a.) sau de preparat ce conține una sau mai multe substanțe active.

Mortalitatea: un animal se înregistrează ca mort atunci când este complet imobil.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se procedează la expunerea albinelor lucrătoare adulte (*Apis mellifera*) la o serie de doze de substanță testată dispersată în soluție de zaharoză. Albinele primesc apoi aceeași hrană, fără substanța testată. Mortalitatea se înregistrează zilnic timp de cel puțin 48 h și se compară cu valorile pentru proba martor. Dacă rata mortalității crește în intervalul dintre 24 ore și 48 ore, în timp ce mortalitatea martorului rămâne la un nivel acceptabil, adică ≤ 10 %, este potrivit să se prelungească durata testului până la maximum 96 h. Se analizează rezultatele pentru a calcula valoarea DL_{50} la 24 h și 48 h și, dacă studiul se prelungește, la 72 h și 96 h.

1.4. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— media mortalității pentru numărul total de martori trebuie să fie mai mică sau egală cu 10 % la sfârșitul testului;

— DL_{50} a etalonului de toxicitate să se încadreze în intervalul specificat.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Colectarea albinelor**

Este necesar să se utilizeze albinele lucrătoare adulte tinere din același roi, adică albinele de aceeași vârstă, modalitate de hrană etc. Albinele se obțin din colonii hrănite în mod corespunzător, sănătoase, pe cât posibil fără boli și care provin din aceeași regină, cu antecedente și stare fiziologică cunoscute. Acestea se pot colecta în dimineața în care se utilizează sau în seara de dinaintea testului și ținute în condițiile experimentale până

în ziua următoare. Sunt potrivite albinele colectate din rame fără progenituri. Se evită colectarea primăvara devreme sau toamna târziu, deoarece albinele au o fiziologie modificată în perioadele menționate. Dacă este necesară efectuarea testelor la începutul primăverii sau sfârșitul toamnei, albinele se pot introduce într-un incubator și se hrănesc timp de o săptămână cu „pâinea albinelor" (polen recoltat din fagure) și soluție de zaharoză. Albinele tratate cu substanțe chimice, ca antibiotice, produse antivirale etc. nu se utilizează în testele de toxicitate timp de patru săptămâni din momentul terminării ultimului tratament.

1.5.2. **Condiții de adăpost și hrană**

Se utilizează cuști ușor de curățat și cu ventilație bună. Se poate utiliza orice material corespunzător, de exemplu oțel inoxidabil, plasă de sârmă, cuști din material plastic sau din lemn disponibile etc. Se preferă grupuri de 10 albine în fiecare cușcă. Dimensiunile cuștilor experimentale trebuie să corespundă numărului de albine, adică să asigure spațiul corespunzător.

Albinele se țin la întuneric într-o cameră experimentală la o temperatură de 25 ± 2 °C. Pe toată durata testului, se înregistrează umiditatea relativă, care este în mod normal de aproximativ 50-70 %. Manipularea, care include tratamentul și observațiile se efectuează la lumină (lumina zilei). Ca hrană se utilizează soluție apoasă de zaharoză cu o concentrație finală de 500g/l (50 % greutate/volum). După administrarea dozelor de testare, hrana se furnizează *ad libitum*. Este necesar ca sistemul de alimentare să permită înregistrarea hranei consumate în fiecare cușcă (1.6.3.1.). Se poate utiliza o eprubetă (cu lungimea de aproximativ 50 mm și diametrul de aproximativ 10 mm cu capătul deschis îngustat până la un diametru de aproximativ 2 mm).

1.5.3. **Pregătirea albinelor**

Albinele colectate se repartizează în mod aleatoriu în cuștile experimentale, care se aranjează în mod aleatoriu în camera experimentală.

Albinele se pot înfometa timp de până la 2 ore înaintea începerii testului. Se recomandă ca albinele să fie lipsite de hrană înaintea tratamentului, astfel încât, la începutul testului, intestinele tuturor albinelor să aibă același conținut. Albinele muribunde se resping și se înlocuiesc cu albine sănătoase înaintea începerii testului.

1.5.4. **Pregătirea dozelor**

Dacă substanța testată este un compus miscibil cu apa, se poate dispersa direct în soluția de zaharoză 50 %. Pentru produsele și substanțele tehnice cu solubilitate mică în apă, se pot utiliza purtători care pot să fie solvenți organici, emulgatori sau agenți de dispersie cu toxicitate mică pentru albine (de exemplu, acetone, dimetilformamidă, dimetilsulfoxid). Concentrația purtătorului depinde de solubilitatea substanței testate și ar trebui să fie aceeași pentru toate concentrațiile experimentate ale substanței. Cu toate acestea, în general, este potrivită o concentrație a purtătorului de 1 % care nu trebuie să fie depășită.

Se prepară soluțiile etalon corespunzătoare, adică, dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru solubilizarea substanței încercate, trebuie să se utilizeze două grupe etalon separate: o soluție în apă și o soluție de zaharoză cu solventul/purtătorul la concentrația utilizată în soluțiile de dozare.

1.6. MODUL DE LUCRU

1.6.1. **Grupele experimentale și cele martor**

Numărul de doze și probe identice trebuie să satisfacă condițiile statistice pentru determinarea DL_{50} cu limite de încredere de 95 %. În mod normal, sunt necesare pentru test cinci doze în serie geometrică, cu un factor mai mic sau egal cu 2,2 și care să cuprindă valorile pentru DL_{50}. Cu toate acestea, factorul de diluție și numărul de concentrații pentru dozare trebuie să se determine în funcție de panta curbei de toxicitate (doza funcție de mortalitate) și ținând cont de metoda statistică aleasă pentru analiza rezultatelor. O probă pentru determinarea domeniului permite alegerea concentrațiilor potrivite pentru dozare.

La minimum trei grupe experimentale identice, fiecare de 10 albine, se administrează doze cu fiecare concentrație experimentată. În afară de seriile tratate cu concentrațiile experimentate, se urmăresc minimum trei serii martor, fiecare de 10 albine. Sunt prevăzute serii martor și pentru solvenții/purtătorii utilizați (1.5.4).

1.6.2. **Etalonul de toxicitate**

În seria de teste se include un etalon de toxicitate. Se selectează cel puțin trei doze pentru a cuprinde valorile preconizate ale DL_{50}. Pentru fiecare doză testată se utilizează minimum trei cuști identice, fiecare conținând 10 albine. Etalonul de toxicitate preferat este dimetoatul, pentru care DL_{50}-24 h semnalată se situează între valorile 0,10-0,35 µg s.a./albină (2). Cu toate acestea, dacă se pot furniza suficiente date pentru verificarea răspunsului preconizat la doză, se pot accepta alte etaloane de toxicitate (de exemplu, parationul).

1.6.3. **Expunerea**

1.6.3.1. *Administrarea dozelor*

Fiecărei grupe de albine i se administrează 100-200 µl soluție apoasă 50 % de zaharoză, ce conține substanța testată la concentrația corespunzătoare. Pentru produsele cu solubilitate mică, toxicitate mică sau concentrație mică în preparat este necesar un volum mare, deoarece trebuie să se utilizeze proporții mai mari din soluția de zaharoză. Se monitorizează cantitatea de hrană tratată consumată per grupă. După consumarea hranei (de obicei în 3-4 h), vasul de alimentare se scoate din cușcă și se înlocuiește cu unul care conține numai soluție de zaharoză. Soluțiile de zaharoză se furnizează apoi *ad libitum*. Pentru unii compuși, la concentrații mai mari, respingerea dozei încercate poate să genereze un consum mic sau inexistent de hrană. După maximum 6 h, hrana tratată neconsumată se înlocuiește numai cu soluția de zaharoză. Se evaluează cantitatea de hrană tratată consumată (de exemplu, prin măsurarea raportului volum/greutate pentru hrana tratată neconsumată).

1.6.3.2. *Durata*

Durata testului este de preferință de 48 ore după ce soluția de substanță testată este înlocuită cu soluția de zaharoză singură. Dacă mortalitatea continuă să crească cu mai mult de 10 % după primele 24 h, durata testului se prelungește la maximum 96 ore, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

1.6.4. **Observațiile**

Mortalitatea se înregistrează la 4 h după începerea testului și apoi la 24 h și 48 h (adică după administrarea dozei). Dacă este necesară o perioadă prelungită de observare, se fac alte evaluări la intervale de 24 h, până la maximum 96 h, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

Se estimează cantitatea de hrană consumată per grupă. Compararea cantităților consumate din hrana tratată și netratată în 6 ore de administrare poate furniza date referitoare la gustul plăcut al hranei tratate.

Se consemnează toate manifestările anormale observate în timpul desfășurării testului.

1.6.5. **Testul la valori limită**

În unele cazuri (de exemplu când se preconizează că o substanță testată are o toxicitate mică) se poate efectua un test la valori limită, utilizând 100 µg s.a./albină pentru a demonstra că DL_{50} este mai mare decât valoarea respectivă. Se utilizează același mod de lucru, care include trei grupe experimentale identice pentru dozele experimentate, martorii relevanți, evaluarea cantității de hrană consumată și utilizarea etalonului de toxicitate. Dacă apar mortalități, se efectuează un studiu complet. Dacă se observă efecte subletale (1.6.4), se consemnează.

2. **REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA**

2.1. REZULTATELE

Rezultatele se sistematizează în tabele, care prezintă pentru fiecare grupă supusă tratamentului, precum și pentru grupele martor și cele tratate cu etalon de toxicitate, numărul de albine utilizate, mortalitatea în fiecare moment de observare și numărul de albine cu un comportament negativ. Datele privind mortalitatea se analizează prin metode statistice corespunzătoare (de exemplu, analiza probit, media mobilă, probabilitatea binominală) (3) (4). Se trasează curbele doză-răspuns pentru fiecare observare recomandată și se calculează pantele curbelor și dozele letale medii (DL_{50}) cu limite de încredere de 95 %. Sunt posibile corecții pentru mortalitatea martorului cu ajutorul corecției lui Abbott (4) (5). Dacă hrana tratată nu se consumă în întregime, se determină doza de substanță testată per grupă. DL_{50} se exprimă în µg de substanță testată per albină.

2.2. RAPORTUL TESTULUI

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

2.2.1. **Substanța testată**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante (de exemplu, stabilitatea în apă, presiunea vaporilor);

— datele de identificare chimică, care includ formula structurală, puritatea [adică pentru pesticide, identitatea și concentrația substanței (substanțelor) activă (active)].

2.2.2. **Speciile experimentale**

— denumirea științifică, roiul, vârsta aproximativă (în săptămâni), metoda de colectare, data colectării;

— datele privind coloniile din care s-au colectat albinele experimentale, care includ starea de sănătate, eventuale boli ale adulților, tratamente prealabile etc.

2.2.3. **Condiții experimentale**

— temperatura și umiditatea relativă în camera experimentală;

— condițiile de adăpost care includ tipul, dimensiunea și materialul cuștilor;

— metodele de preparare a soluțiilor mamă și experimentate (se specifică solventul și concentrațiile acestuia, dacă se utilizează);

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (trebuie să se specifice agentul de solubilizare și concentrațiile acestuia, dacă se utilizează);

— protocolul testului, de exemplu numărul de încercări și concentrațiile experimentate, numărul de martori; pentru fiecare concentrație experimentată și martor, numărul de cuști identice, și numărul de albine per cușcă;

— data efectuării testului.

2.2.4. **Rezultatele**

— rezultatele studiului preliminar de determinare a domeniului, dacă s-a efectuat;

— datele brute: mortalitatea la fiecare doză experimentată și fiecare moment de observare;

— trasarea curbelor doză-răspuns la sfârșitul testului;

— valorile DL_{50} cu limite de încredere de 95 %, la fiecare din momentele de observare recomandate, pentru substanța testată și etalonul de toxicitate;

— metodele statistice utilizate pentru determinarea DL_{50};

— mortalitatea la martori;

— alte efecte biologice observate sau măsurate, de exemplu comportamentul anormal al albinelor (inclusiv respingerea dozei cu substanța testată), rata consumului de hrană la grupele tratate și netratate;

— orice abatere de la modul de lucru descris și orice alte date relevante.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(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, pp. 151-165. March 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, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

C.17. ALBINELE - TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PRIN CONTACT

1. **METODA**

Metoda de determinare a toxicității acute reproduce Orientarea 214 a OCDE (1998).

1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate este o metodă de laborator, destinată determinării toxicității acute prin contact a produselor pentru protecția plantelor și a altor produse chimice la albinele lucrătoare adulte.

În evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor, s-ar putea să fie necesară determinarea toxicității acute de contact la albine, de exemplu când este posibilă expunerea albinelor la un anumit produs chimic. Testul de toxicitate acută prin contact se efectuează pentru determinarea toxicității inerente a pesticidelor și altor produse chimice la albine. Rezultatele testului respectiv se utilizează pentru a stabili necesitatea unei evaluări suplimentare. Prezenta metodă se poate utiliza în special în programele în mai multe etape pentru evaluarea pericolelor pesticidelor pentru albine, prin înaintare secvențială de la testele de toxicitate de laborator la experimentările de semi-teren și teren (1). Pesticidele se pot testa sub formă de substanțe active (s.a.) sau de preparate.

Pentru verificarea sensibilității albinelor și a preciziei metodei de testare este necesară utilizarea unui etalon de toxicitate.

1.2. DEFINIȚII

Toxicitatea orală acută: reprezintă efectele negative care apar în termen de maximum 96 ore de la aplicarea locală a unei doze unice dintr-o substanță.

Doza: reprezintă cantitatea de substanță testată aplicată. Doza se exprimă ca masa (μg) de substanță testată per animal experimental (μg/albină).

DL_{50} (doza letală medie) de contact: este o doză unică, obținută statistic, dintr-o substanță care poate provoca moartea a 50 % din animale atunci când se administrează prin contact. Valoarea DL_{50} se exprimă în (μg) de substanță testată per albină. Pentru pesticide, substanța testată poate să fie sub formă de substanță activă (s.a.) sau de preparat ce conține una sau mai multe substanțe active.

Mortalitatea: un animal se înregistrează ca mort atunci când este complet imobil.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se procedează la expunerea albinelor lucrătoare adulte (*Apis mellifera*) la o serie de doze de substanță testată dizolvată într-un purtător corespunzător, prin aplicare directă pe torace (picături). Durata testului este de 48 h. Dacă rata mortalității crește în intervalul dintre 24 ore și 48 ore în timp ce mortalitatea martorului rămâne la un nivel acceptabil, adică ≤ 10 %, este potrivit să se prelungească durata testului până la maximum 96 h. Mortalitatea se înregistrează zilnic și se compară cu valorile martorului. Se analizează rezultatele pentru a calcula valoarea DL_{50} la 24 h și 48 h și, dacă studiul se prelungește, la 72 h și 96 h.

1.4. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— media mortalității pentru numărul total de martori trebuie să fie mai mică sau egală cu 10 % la sfârșitul testului;

— DL_{50} a etalonului de toxicitate să se încadreze în intervalul specificat.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Colectarea albinelor**

Este necesar să se utilizeze albinele lucrătoare adulte tinere, adică albinele de aceeași vârstă, modalitate de hrană, din același roi etc. Albinele se obțin din colonii hrănite în mod corespunzător, sănătoase, pe cât posibil fără boli și care provin din aceeași regină, cu antecedente și stare fiziologică cunoscute. Acestea se pot colecta în dimineața în care se utilizează sau în seara de dinaintea testului și ținute în condițiile

experimentale până în ziua următoare. Sunt potrivite albinele colectate din rame fără progenituri. Se evită colectarea primăvara devreme sau toamna târziu, deoarece albinele au o fiziologie modificată în perioadele menționate. Dacă este necesară efectuarea testelor la începutul primăverii sau sfârșitul toamnei, albinele se pot introduce într-un incubator și se hrănesc timp de o săptămână cu „pâinea albinelor" (polen recoltat din fagure) și soluție de zaharoză. Albinele tratate cu substanțe chimice, ca antibiotice, produse antivirale etc. nu se utilizează în testele de toxicitate timp de patru săptămâni din momentul terminării ultimului tratament.

1.5.2. **Condiții de adăpost și hrană**

Se utilizează cuști ușor de curățat și cu ventilație bună. Se poate utiliza un material corespunzător, de exemplu oțel inoxidabil, plasă de sârmă, cuști din material plastic sau din lemn disponibile etc. Dimensiunile cuștilor experimentale trebuie să corespundă numărului de albine, adică să asigure spațiul corespunzător. Se preferă grupuri de 10 albine în fiecare cușcă.

Albinele se țin la întuneric într-o cameră experimentală la o temperatură de 25 ± 2 °C. Pe toată durata testului, se înregistrează umiditatea relativă, care este în mod normal de aproximativ 50-70 %. Manipularea, care include tratamentul și observațiile se efectuează la lumină (lumina zilei). Ca hrană se utilizează soluție apoasă de zaharoză cu o concentrație finală de 500g/l (50 % greutate/volum) și se furnizează *ad libitum* pe durata testului, într-un vas de alimentare. Acesta poate să fie o eprubetă (cu lungimea de aproximativ 50 mm și diametrul de aproximativ 10 mm cu capătul deschis îngustat până la un diametru de aproximativ 2 mm).

1.5.3. **Pregătirea albinelor**

Albinele colectate se anesteziază cu bioxid de carbon sau azot pentru aplicarea substanței testate. Cantitatea de anestezic utilizat și durata expunerii trebuie să fie minime. Albinele muribunde se resping și se înlocuiesc cu albine sănătoase înaintea începerii testului.

1.5.4. **Pregătirea dozelor**

Substanța testată urmează să se aplice sub formă de soluție într-un purtător, adică un solvent organic sau o soluție apoasă cu un agent de umectare. Ca solvent organic, se preferă acetona, dar se pot utiliza și alți solvenți organici cu toxicitate mică pentru albine (de exemplu, dimetilformamidă, dimetilsulfoxid). Pentru preparatele dispersate în apă și substanțele organice cu polaritate mare, care nu sunt solubile în solvenții organici purtători, soluțiile se pot aplica mai ușor, dacă se prepară într-o soluție slabă de agent de umectare comercializat (de exemplu, Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Se prepară soluțiile etalon corespunzătoare, adică, dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru solubilizarea substanței testate, trebuie să se utilizeze două grupe etalon separate: una tratată cu apă și una tratată cu solvent/agent de dispersie.

1.6. MODUL DE LUCRU

1.6.1. **Grupele experimentale și cele martor**

Numărul de doze și probe identice experimentate trebuie să satisfacă condițiile statistice pentru determinarea DL_{50} cu limite de încredere de 95 %. În mod normal, sunt necesare pentru test cinci doze în serie geometrică, cu un factor mai mic sau egal cu 2,2 și care să cuprindă valorile pentru DL_{50}. Cu toate acestea, factorul de diluție și numărul de concentrații pentru dozare trebuie să se determine în funcție de panta curbei de toxicitate (doza funcție de mortalitatea) și ținând cont de metoda statistică aleasă pentru analiza rezultatelor. O probă pentru determinarea domeniului permite alegerea concentrațiilor potrivite pentru dozare.

La minimum trei grupe experimentale identice, fiecare de 10 albine, se administrează doze cu fiecare concentrație experimentată.

În afară de seriile tratate cu concentrațiile experimentate, se urmăresc minimum trei serii martor, fiecare de 10 albine. Dacă se utilizează un solvent organic sau un agent de umectare, trebuie să se includă trei serii martor suplimentare, de câte 10 albine fiecare.

1.6.2. **Etalonul de toxicitate**

În seria de teste se include un etalon de toxicitate. Se selectează cel puțin trei doze pentru a cuprinde valorile preconizate ale DL_{50}. Pentru fiecare doză experimentată se utilizează minimum trei cuști identice, fiecare conținând 10 albine. Etalonul de toxicitate preferat este dimetoatul, pentru care DL_{50}-24 h prin contact semnalată se situează între valorile 0,10-0,35 µg s.a./albină (2). Cu toate acestea, dacă se pot furniza suficiente date pentru verificarea răspunsului preconizat la doză, se pot accepta alte etaloane de toxicitate (de exemplu, paration).

1.6.3. **Expunerea**

1.6.3.1. *Administrarea dozelor*

Albinele anesteziate se tratează individual prin aplicare locală. Albinele se distribuie în mod aleatoriu pentru diferite doze experimentate și diferiți martori. Se aplică un volum de 1 µl soluție de substanță testată în concentrații potrivite cu o micropipetă pe partea dorsală a toracelui fiecărei albine. Dacă este necesar, se pot utiliza alte volume. După aplicare, albinele sunt repartizate în cuști și li se administrează soluții de zaharoză.

1.6.3.2. *Durata*

Durata testului este de preferință de 48 ore. Dacă mortalitatea crește cu mai mult de 10 % între 24 h și 48 h, durata testului se prelungește la maximum 96 ore, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

1.6.4. **Observațiile**

Mortalitatea se înregistrează la 4 h după administrarea dozelor și apoi la 24 h și 48 h. Dacă este necesară o perioadă prelungită de observare, se fac alte evaluări la intervale de 24 h, până la maximum 96 h, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

Se consemnează toate manifestările anormale observate în timpul desfășurării testului.

1.6.5. **Testul la valori limită**

În unele cazuri (de exemplu, când se preconizează că o substanță testată are o toxicitate mică) se poate efectua un test la valori limită, utilizând 100 µg s.a./albină pentru a demonstra că DL_{50} este mai mare decât valoarea respectivă. Se utilizează același mod de lucru, care include trei grupe experimentale identice pentru dozele experimentate, martorii relevanți și utilizarea etalonului de toxicitate. Dacă se observă efecte subletale (a se vedea punctul 1.6.4), se consemnează.

2. **REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA**

2.1. REZULTATELE

Rezultatele se sistematizează în tabele, care prezintă pentru fiecare grupă supusă tratamentului, precum și pentru grupele martor și cele tratate cu etalon de toxicitate, numărul de albine utilizate, mortalitatea în fiecare moment de observare și numărul de albine cu un comportament negativ. Datele privind mortalitatea se analizează prin metode statistice corespunzătoare (de exemplu, analiza probit, media mobilă, probabilitatea binominală) (3) (4). Se trasează curbele doză-răspuns pentru fiecare observare recomandată (adică la 24 h, 48 h și, dacă este relevant, 72 h, 96 h) și se calculează pantele curbelor și dozele letale medii (DL_{50}) cu limite de încredere de 95 %. Sunt posibile corecții pentru mortalitatea martorului cu ajutorul corecției lui Abbott (4) (5). DL_{50} se exprimă în µg de substanță testată per albină.

2.2. RAPORTUL TESTULUI

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

2.2.1. **Substanța testată**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante (de exemplu, stabilitatea în apă, presiunea de vapori);

— datele de identificare chimică, care includ formula structurală, puritatea [adică pentru pesticide, identitatea și concentrația substanței (substanțelor) activă (active)].

2.2.2. **Speciile experimentale**

— denumirea științifică, roiul, vârsta aproximativă (în săptămâni), metoda de colectare, data colectării,

— datele privind coloniile din care s-au colectat albinele experimentale, care includ starea de sănătate, eventuale boli ale adulților, tratamente prealabile, etc.

2.2.3. **Condiții experimentale**

— temperatura și umiditatea relativă în camera experimentală,

— condițiile de adăpost care includ tipul, dimensiunea și materialul cuștilor,

— metodele de administrare a substanței testate, de exemplu, solventul purtător utilizat, volumul soluției de substanță testată aplicat, anestezicele utilizate,

— protocolul testului, de exemplu, numărul de încercări și concentrațiile testate, numărul de martori; pentru fiecare concentrație experimentată și martor, numărul de cuști identice, și numărul de albine per cușcă,

— data efectuării testului.

2.2.4 **Rezultatele**

— rezultatele studiului preliminar de determinare a domeniului, dacă s-a efectuat;

— datele brute: mortalitatea la fiecare concentrație experimentată și fiecare moment de observare;

— trasarea curbelor doză-răspuns la sfârșitul testului;

— valorile DL_{50} cu limite de încredere de 95 %, la fiecare din momentele de observare recomandate, pentru substanța testată și etalonul de toxicitate;

— metodele statistice utilizate pentru determinarea DL_{50};

— mortalitatea la martori;

— alte efecte biologice observate sau măsurate și orice răspunsuri anormale ale albinelor;

— orice abatere de la modul de lucru descris și orice alte date relevante.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(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, pp. 151-165. March 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, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

C.18. ADSORBȚIA/DESORBȚIA PRINTR-O METODĂ DE STABILIRE A ECHILIBRULUI PROBELOR

1. METODA

Prezenta metodă reproduce Orientarea 106 a OCDE, pentru determinarea adsorbției/desorbției printr-o metodă de stabilire a echilibrului probelor (2000).

1.1. INTRODUCERE

Metoda ia în considerare un test de intercalibrare și un schimb de experiență în vederea selecției solului pentru realizarea unei încercări de adsorbție (1) (2) (3) (4) și, de asemenea, liniile directoare existente la nivel național (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Studiile de adsorbție/desorbție sunt utile pentru obținerea de date esențiale privind mobilitatea substanțelor chimice și distribuția acestora în compartimentele solului, apei și aerului din biosferă (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) . Datele se pot utiliza pentru a prognoza sau estima, de exemplu, predispoziția unei substanțe chimice pentru degradare (22) (23), transformare sau asimilare de organisme (24); extracție prin spălare în profilul solului (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilitate din sol (21) (29) (30); scurgere de pe suprafața terenurilor în apele naturale (18) (31) (32). Rezultatele adsorbției se pot utiliza pentru comparare și modelare (19) (33) (34) (35).

Distribuția unei substanțe chimice între fazele solului şi cea apoasă este un proces complex care depinde de o serie de factori diferiți: natura chimică a substanței (12) (36) (37) (38) (39) (40), caracteristicile solului (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), factorii climatici cum sunt precipitațiile atmosferice, temperatura, lumina soarelui și vântul. Astfel, numeroasele fenomene și mecanisme implicate în procesul de adsorbție a unei substanțe chimice în sol nu se pot explica în întregime printr-un model simplificat de laborator, cum este prezenta metodă. Cu toate acestea, chiar dacă o experiență de acest fel nu poate să cuprindă toate cazurile posibile din mediu, poate furniza date valoroase privind relația dintre mediul înconjurător și adsorbția unei substanțe chimice.

A se vedea și introducerea generală.

1.2. DOMENIUL DE APLICARE

Metoda are ca obiect determinarea comportamentului de adsorbție/desorbție al unei substanțe pe diferite soluri. Scopul este obținerea unei valori a sorbției care să se poată utiliza la prognoza repartiției în condiții de mediu diferite; în acest scop, se determină coeficienții de adsorbție la echilibru pentru o substanță chimică pe diferite soluri în funcție de caracteristicile solului (de exemplu, conținutul de carbon organic, conținutul de argilă și structura și pH-ul solului). Trebuie să se utilizeze tipuri diferite de soluri pentru a cuprinde cât mai multe interacțiuni posibile ale unei anumite substanțe cu solurile existente în natură.

În prezenta metodă, adsorbția reprezintă procesul de legare a unei substanțe chimice la suprafețele solurilor; nu se poate face deosebire între diferitele procese de adsorbție (adsorbția fizică și chimică) și procese ca degradarea catalizată a suprafeței, adsorbția în grosime sau reacția chimică. Adsorbția care apare pe particulele coloidale (diametrul < 0,2 μm) generate de soluri nu se ia în considerare.

Parametrii solurilor considerați cei mai importanți pentru adsorbție sunt: conținutul de carbon organic (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); conținutul de argilă și structura solului (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) și valoarea pH-ului pentru compușii ionizabili (3) (4) (42). Alți parametri ai solurilor care pot să aibă un impact asupra adsorbției/desorbției unei anumite substanțe sunt: capacitatea efectivă de schimb de cationi (CESC), conținutul de oxizi de fier și aluminiu amorfi, în special pentru solurile vulcanice și tropicale (4), precum și suprafața specifică (49).

Testarea este destinată evaluării adsorbției unei substanțe chimice pe diferite tipuri de soluri cu valori diferite ale conținutului de carbon organic, ale conținutului de argilă și ale structurii solului și ale pH-ului. Aceasta conține trei etape:

Etapa 1: Studiu preliminar pentru determinarea:

— raportului sol/soluție;

— timpului de stabilire a echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță încercată adsorbită la echilibru;

— adsorbției substanței încercate pe suprafața vaselor experimentale și stabilității substanței încercate în timpul încercării.

Etapa 2: Proba de identificare: se studiază adsorbția pe cinci tipuri diferite de soluri cu ajutorul cineticii adsorbției la o singură concentrație și se determină coeficienții de distribuție K_d și K_{co}.

Etapa 3: Determinarea izotermelor de adsorbție Freundlich pentru stabilirea influenței concentrației asupra gradului de adsorbție pe soluri.

Studiul desorbției cu ajutorul cineticii de desorbție/izotermele de desorbție Freundlich (apendicele 1).

1.3. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Simbol	Definiție	Unități
A_{t_i}	adsorbția la momentul t_i	%
A_{ec}	adsorbția la stabilirea echilibrului de adsorbție	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masa substanței încercate adsorbite pe sol la momentul t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masa substanței încercate adsorbite pe sol în intervalul de timp Δt_i	µg
$m_s^{ads}(ec)$	masa substanței încercate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție	µg
m_0	masa substanței încercate din eprubetă, la începutul analizei de adsorbție	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masa substanței încercate măsurate într-un alicot (v_a^A) la momentul t_i	µg
$m_{ap}^{ads}(ec)$	masa substanței încercate în soluție la echilibrul de adsorbție	µg
m_{sol}	cantitatea fazei de sol, exprimată în substanță uscată a solului	g
C_{sm}	concentrația masică a soluției mamă de substanță	µg cm^{-3}
C_0	concentrația masică inițială a soluției încercate în contact cu solul	µg cm^{-3}
$C_{ap}^{ads}(t_i)$	concentrația masică a substanței în fază apoasă la momentul t_i de efectuare a încercării	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(ec)$	conținutul de substanță adsorbită pe sol la echilibrul de adsorbție	µg g^{-1}
$C_{ap}^{ads}(ec)$	concentrația masică a substanței în faza apoasă la echilibrul de adsorbție	µg cm^{-3}
V_0	volumul inițial al fazei apoase în contact cu solul în timpul încercării de adsorbție	cm^3
v_a^A	volumul alicotului în care se măsoară substanța testată	cm^3
K_d	coeficientul de distribuție pentru adsorbție	cm^3 g^{-1}
K_{co}	coeficientul de adsorbție normalizată a carbonului organic	cm^3 g^{-1}
K_{so}	coeficientul de distribuție normalizată a substanței organice	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coeficientul de adsorbție Freundlich	$\mu g^{1-1/n}$ (cm^3) 1/n g^{-1}
1/n	exponentul Freundlich	
D_{t_i}	desorbția la momentul t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorbția corespunzătoare unui interval de timp Δt_i	%
K_{des}	coeficientul de desorbție aparentă	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coeficientul de desorbție Freundlich	$\mu g^{1-1/n}$ (cm^3) 1/n g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masa substanței încercate desorbite din sol la momentul t_i	µg

Simbol	Definiție	Unități
$m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$	masa substanței încercate desorbite din sol în intervalul de timp Δt_i	µg
$m_{m}^{des}(ec)$	masa substanței, determinată analitic în fază apoasă la stabilirea echilibrului de desorbție	µg
$m_{ap}^{des}(ec)$	masa totală a substanței încercate desorbite la stabilirea echilibrului de desorbție	µg
$m_{s}^{des}(\Delta t_i)$	masa substanței adsorbită în continuare pe sol după intervalul de timp Δt_i	µg
m_{aq}^{A}	masa substanței rămase de la stabilirea echilibrului de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului	µg
$C_{s}^{des}(ec)$	conținutul de substanță testată adsorbită în continuare pe sol la stabilirea echilibrului de desorbție	µg g^{-1}
$C_{ap}^{des}(ec)$	concentrația masică a substanței încercate în fază apoasă la stabilirea echilibrului de desorbție	µg cm^{-3}
V_T	volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul experimentării cineticii de desorbție prin metoda în serie	cm^3
V_R	volumul supernatantului scos din eprubetă după stabilirea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum dintr-o soluție 0,01 M de $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volumul unui alicot din care s-au luat probe pentru analiză la momentul (i), în timpul experimentării cineticii de desorbție prin metoda în serie	cm^3
V_r^i	volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru determinarea substanței încercate, în experimentarea cineticii de desorbție prin metoda paralelă	cm^3
V_r^F	volumul soluției luate din eprubetă pentru determinarea substanței încercate, la stabilirea echilibrului de desorbție	cm^3
BM	bilanțul masic	%
m_E	masa totală a substanței încercate extrase din sol și pereții vasului experimental în două etape	µg
V_{rec}	volumul supernatantului recuperat după stabilirea echilibrului de adsorbție	cm^3
P_{oa}	coeficientul de partiție octanol/apă	
pKa	constanta de disociere	
S_a	solubilitatea apei	g l^{-1}

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se adaugă volume cunoscute de soluții ale substanței încercate, nemarcate sau marcate radioactiv, în concentrații cunoscute în $CaCl_2$ 0,01 M, la probele de sol cu un conținut de substanță uscată cunoscut, care au fost aduse în prealabil la echilibru în $CaCl_2$ 0,01 M. Se agită amestecul un timp corespunzător. Suspensiile de sol se separă apoi prin centrifugare și, dacă se dorește, prin filtrare și se analizează faza apoasă. Se calculează cantitatea de substanță testată adsorbită pe proba de sol prin diferența dintre cantitatea de substanță testată prezentă inițial în soluție și cantitatea rămasă la sfârșitul experimentării (metoda indirectă).

Ca alternativă, cantitatea de substanță testată adsorbită se mai poate determina direct prin analiza solului (metoda directă). Această metodă, care include extracția treptată a solului cu un solvent potrivit, se recomandă în cazurile în care concentrația diferită în soluție a substanței nu se poate determina cu precizie. Exemple de asemenea cazuri sunt: adsorbția substanței încercate pe suprafața vaselor experimentale, instabilitatea substanței încercate pe durata experimentării, adsorbția slabă care generează doar modificări mici ale concentrației în soluție și adsorbția puternică care generează concentrații mici care nu se pot determina cu precizie. Dacă se utilizează o substanță marcată radioactiv, se poate evita extracția solului prin

analiza fazei de sol prin calcinare și numărătoarea în scintilație lichidă. Cu toate acestea, numărătoarea în scintilație lichidă este un procedeu nespecific care nu poate să facă diferența dintre produsele de bază și cele de transformare; prin urmare, se utilizează numai în situația în care substanța chimică încercată este stabilă pe durata studiului.

1.5. DATE PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

Reactivii chimici trebuie să fie de tip analitic. Se recomandă utilizarea substanțelor de testare nemarcate cu o compoziție cunoscută și, de preferat, cu o puritate de minimum 95 % sau a substanțelor de testare marcate radioactiv cu o compoziție și puritate cunoscute. La indicatorii cu perioada de înjumătățire scurtă se aplică corecții de dezintegrare.

Înaintea realizării unei încercări de adsorbție/desorbție, trebuie să fie cunoscute datele referitoare de substanța testată, prezentate în continuare:

(a) solubilitatea în apă (A.6);

(b) presiunea de vapori (A.4) și constanta legii lui Henry;

(c) degradarea abiotică: hidroliza în funcție de pH (C.7);

(d) coeficientul de partiție (A.8);

(e) biodegradabilitatea imediată (C.4) sau transformarea aerobică și anaerobică în sol;

(f) pKa pentru substanțele ionizabile;

(g) fotoliza directă în apă (adică spectrul de absorbție UV-vizibil în apă, randamentul cuantic) și fotodegradarea pe sol.

1.6. APLICABILITATEA ÎNCERCĂRII

Testarea se poate aplica substanțelor chimice pentru care este disponibilă o metodă analitică suficient de precisă. Un parametru important care influențează credibilitatea rezultatelor, în special atunci când se utilizează metoda indirectă, este stabilitatea substanței încercate în scara de timp a probei. Prin urmare, este necesară verificarea stabilității într-un studiu preliminar; dacă, în scara de timp a încercării, se observă o modificare, se recomandă ca studiul principal să se realizeze prin analizarea atât a solului cât și a fazelor apoase.

În realizarea prezentei încercări, pot să apară dificultăți pentru substanțele cu solubilitate mică în apă ($S_a < 10^{-4}$ g l^{-1}), precum și pentru substanțele cu sarcini mari, deoarece concentrația în faza apoasă nu se poate măsura analitic cu suficientă precizie. În situațiile de acest fel, trebuie să se ia măsuri suplimentare. Modalitatea de rezolvare a acestor probleme se indică, orientativ, la punctele respective ale prezentei metode.

La testarea substanțelor volatile, trebuie să se aibă grijă să se evite pierderile în timpul studiului.

1.7. DESCRIEREA METODEI

1.7.1. **Aparatura și reactivii chimici**

Aparatură standard de laborator, în special cea prezentată în continuare:

(a) Eprubete sau vase pentru realizarea experimentelor. Este important ca epubetele și vasele respective:

— să fie instalate direct în centrifugă pentru a minimiza erorile de manipulare și transfer;

— să fie obținute dintr-un material inert, care minimizează adsorbția substanței încercate pe suprafața acestora.

(b) Agitator: agitator acționat de sus sau un dispozitiv echivalent; agitatorul menține solul în suspensie în timpul agitării.

(c) Centrifugă: de preferință una de viteză mare, de exemplu forțele de centrifugare > 3 000 g, termoreglabilă, care să poată să separe particulele cu diametrul mai mare de 0,2 μm din soluția apoasă. Recipientele trebuie să fie închise în timpul agitării și centrifugării pentru a evita volatilizarea și pierderile de apă; pentru a minimiza adsorbția pe acestea, se recomandă utilizarea capacelor dezactivate, cum ar fi capacele cu filet căptușite cu teflon.

(d) Opțional: dispozitiv de filtrare; filtre cu o porozitate de 0,2 μm, sterile, de unică folosință. Trebuie să se acorde o atenție deosebită la alegerea materialului pentru filtru, pentru a evita pierderile de substanță testată pe acesta; pentru substanțele încercate cu solubilitate mică, nu se recomandă un material de filtrare organic.

(e) Instrumente analitice, potrivite pentru măsurarea concentrației substanței încercate.

(f) etuvă de laborator care permite menținerea unei temeraturi de103-110 °C.

1.7.2. **Caracterizarea și selectarea solurilor**

Solurile se caracterizează prin trei parametri de care se consideră că depinde în mare măsură capacitatea adsorbantă: carbonul organic, conținutul de argilă și structura solului și pH-ul. După cum s-a menționat deja (a se vedea Domeniul de aplicare), și alte proprietăți fizico-chimice ale solului pot să aibă impact asupra adsorbției/desorbției unei anumite substanțe și, aceste cazuri, trebuie avute în vedere.

Metodele utilizate pentru caracterizarea solului sunt foarte importante și pot avea o influență semnificativă asupra rezultatelor. Prin urmare, se recomandă ca pH-ul solului să se măsoare într-o soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (adică soluția utilizată în testarea de adsorbție/desorbție) conform metodei ISO corespunzătoare (ISO-10390-1). Se mai recomandă determinarea altor proprietăți relevante ale solului conform metodelor standard (de exemplu, „Îndreptarul pentru analiza solului" ISO); acest lucru permite ca analiza datelor privind sorbția să se facă pe baza parametrilor solului standardizați la nivel mondial. O orientare pentru metodele standard existente pentru analiza și caracterizarea solului este oferită în bibliografie (50-52). Pentru etalonarea metodelor de analiză a solului, se recomandă utilizarea solurilor de referință.

O orientare privind selecția solurilor pentru încercările de adsorbție/desorbție se prezintă în tabelul 1. Cele șapte soluri selectate cuprind tipurile de soluri întâlnite în zonele geografice temperate. Pentru substanțele încercate ionizabile, solurile selectate trebuie să cuprindă un domeniu larg de pH, pentru a fi posibilă evaluarea adsorbției substanței în formele ionizată și neionizată ale acesteia. O orientare privind modul de utilizare a mai multor soluri diferite în diferite etape ale încercării se prezintă la punctul. 1.9. Realizarea încercării.

Dacă se preferă alte tipuri de soluri, este necesar ca parametrii și variația proprietăților acestora să fie similare cu cele descrise în tabelul 1, chiar dacă nu satisfac criteriile cu exactitate.

Tabelul 1: **Orientare pentru selectarea probelor de soluri pentru adsorbție-desorbție**

Tipul solului	Valorile pH-ului (în $CaCl_2$ 0,01 M)	Conținutul de carbon organic (%)	Conținutul de argilă (%)	Structura solului (1)
1	4,5	1,0-2,0	65-80	argilă
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	pământ argilos-nisipos
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	argilă nisipoasă din aluviuni
4	4,0-5,5	3,0- 4,0	15-30	argilă nisipoasă
5	< 4,0-6,0 (2)	< 0,5-1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	nisip argilos
6	> 7,0	< 0,5-1,0 (2) (3)	40-65	pământ argilos-nisipos/argilă
7	< 4,0	>10	< 10	nisip/nisip argilos

(1) Conform FAO și sistemului SUA (85).

(2) Este de preferat ca parametrii respectivi să prezinte valori în domeniul dat. Dacă, totuși, apar dificultăți în găsirea unui sol corespunzător, se acceptă valorile mai mici decât minimum indicat.

(3) Solurile cu un conținut de carbon organic mai mic de 3 % pot schimba corelația dintre conținutul de substanțe organice și adsorbție. Astfel, se recomandă utilizarea solurilor cu un conținut minim de carbon organic de 0,3 %.

1.7.3. **Colectarea și depozitarea probelor de sol**

1.7.3.1. *Colectarea*

Nu se recomandă tehnici de prelevare a probelor sau instrumente specifice; tehnica de prelevare a probelor depinde de scopul studiului (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Se au în vedere cele menționate în continuare:

(a) este necesară o descriere detaliată a situației terenului; aceasta include poziția, acoperirea cu vegetație, tratamentul cu pesticide și îngrășăminte, adaosuri biologice sau contaminarea accidentală. Este necesar să se respecte recomandările standardelor ISO privind prelevarea probelor de sol (ISO 10381-6), referitoare la descrierea locului de prelevare a probelor;

(b) locul de prelevare a probelor trebuie să fie stabilit cu ajutorul UTM (proiecția Mercator transversală universală/ cota convențională europeană) sau a coordonatelor geografice; astfel ar fi posibilă repetarea colectării unui anumit sol în viitor sau ar ajuta la încadrarea solului în diferite sisteme de clasificare utilizate în diferite țări. De asemenea, se recomandă să se colecteze sol numai din planul de referință A de până la 20 cm adâncime. În special pentru tipul de sol nr. 7, dacă există un plan de referință O_h ca parte a solului, acesta se include în prelevarea probelor.

Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură care să garanteze păstrarea proprietăților inițiale ale solului, nealterate în mare parte.

1.7.3.2. *Depozitarea*

Se preferă utilizarea solurilor proaspăt colectate de pe teren. Numai dacă acest lucru nu este posibil, solul se poate păstra la temperatura ambiantă și în aer uscat. Nu se recomandă termene limită, dar solurile depozitate mai mult de trei ani se analizează din nou înaintea utilizării pentru determinarea conținutului de carbon organic, pH-ului și CSC (capacitatea de schimb de cationi).

1.7.3.3. *Manipularea și pregătirea probelor de sol pentru testare*

Solurile se usucă în aer la temperatura ambiantă (de preferință la 20-25 °C). Dezagregarea se realizează cu o forță minimă, astfel încât structura originală a solului să se modifice cât se poate de puțin. Solurile se cern până la dimensiuni ale particulelor ≤ 2 mm; se respectă recomandările standardului ISO privind prelevarea probelor de sol (ISO 10381-6), referitoare la cernere. Se recomandă omogenizarea atentă, deoarece aceasta crește reproductibilitatea rezultatelor. Conținutul de umiditate din fiecare sol se determină pe trei alicoți și încălzire la 105 °C până la greutate constantă (aproximativ 12 ore). În toate calculele, pentru masa de sol se consideră masa uscată în etuvă, adică greutatea solului la care se aplică corecția pentru conținutul de umiditate.

1.7.4. **Pregătirea substanței încercate pentru aplicarea pe sol**

Substanța testată se dizolvă într-o soluție de $CaCl_2$ 0,01 M în apă distilată sau apă deionizată; soluția de $CaCl_2$ se utilizează sub formă de fază apoasă de solvent pentru îmbunătățirea centrifugării și minimizarea schimbului de cationi. Concentrația soluției mamă este, de preferință, mai mare cu trei ordine de mărime decât limita de detecție a metodei analitice utilizate. Pragul menționat asigură măsurători precise pentru metodologia urmată în prezenta metodă; în afară de aceasta, concentrația soluției mamă trebuie să fie mai mică decât solubilitatea în apă a substanței de încercat.

Este de preferat ca soluția mamă să se prepare chiar înaintea aplicării pe probele de sol și să se păstreze închisă, la întuneric, la 4 °C. Durata depozitării depinde de stabilitatea substanței încercate și de concentrația acesteia în soluție.

Numai pentru substanțele cu solubilitate mică ($S_a < 10^{-4}$ g l^{-1}), ar putea să fie necesar un agent de solubilizare corespunzător, dacă dizolvarea substanței încercate este dificilă. Agentul de solubilizare respectiv: (a) trebuie să fie miscibil cu apa, de exemplu metanol sau acetonitril; (b) concentrația acestuia nu trebuie să fie mai mare de 1 % din volumul total al soluției mamă și să reprezinte mai puțin decât cea din soluția substanței încercate care va veni în contact cu solul (de preferință mai mică de 0,1 %); și (c) nu trebuie să fie un agent tensioactiv sau să intre în reacții solvolitice cu substanța chimică încercată. Utilizarea unui agent de solubilizare se stipulează și se justifică în raportarea rezultatelor.

O altă posibilitate pentru substanțele cu solubilitate mică constă în adăugarea substanței încercate în sistemul experimental prin îmbogățire: substanța de încercat se dizolvă într-un solvent organic, din care se ia un alicot care se adaugă în sistemul format din sol și soluție de $CaCl_2$ 0,01 M în apă distilată sau deionizată. Conținutul de solvent organic în faza apoasă se menține cât se poate de mic, de obicei mai mic sau egal cu 0,1 %. Se poate ca îmbogățirea dintr-o soluție organică să nu fie reproductibilă din punct de vedere al volumului. Astfel, se poate introduce încă o eroare, deoarece concentrația substanței încercate și a cosolventului s-ar putea să nu fie aceleași în toate încercările.

1.8. CONDIȚII NECESARE PENTRU REALIZAREA ÎNCERCĂRII DE ADSORBȚIE/DESORBȚIE

1.8.1. **Metoda analitică**

Parametrii importanți care pot să influențeze precizia măsurătorilor de sorbție includ acuratețea metodei analitice pentru analiza atât a fazei soluției cât și a celei adsorbite, stabilitatea și puritatea substanței încercate, realizarea echilibrului de sorpție, amploarea variației concentrației soluției, raportul sol/soluție și modificările din structura solului în timpul procesului de stabilire a echilibrului (35) (59-62). Câteva exemple privind problemele de acuratețe sunt prezentate în apendicele 2.

Trebuie să se verifice fiabilitatea metodei analitice pentru un domeniu de concentrații care se pot întâlni în timpul încercării. Cercetătorul trebuie să aibă libertatea de a elabora o metodă potrivită care să prezinte acuratețe, precizie, reproductibilitate, limite de detecție și recuperare optime. În continuare, se oferă o orientare privind modul de efectuare a acestei încercări.

Un volum potrivit de $CaCl_2$ 0,01 M, de exemplu 100 cm^3, se supune agitării timp de 4 ore împreună cu o cantitate de sol, de exemplu 20 g, cu o capacitate mare de adsorbție, adică cu un conținut mare de carbon organic și argilă; greutățile și volumele menționate pot să varieze în funcție de necesitățile analitice, dar ca punct de plecare se preferă un raport sol/soluție de 1:5. Amestecul se supune centrifugării și faza apoasă se poate filtra. Se adaugă un volum determinat de soluție mamă a substanței încercate la aceasta din urmă pentru a obține o concentrație nominală care să se încadreze în domeniul de concentrații care se pot întâlni în timpul încercării. Volumul respectiv trebuie să fie mai mic sau egal cu 10 % din volumul final al fazei apoase, pentru a modifica cât se poate de puțin natura soluției la preechilibru. Se analizează soluția.

Pentru verificarea artefactelor din metoda analitică și a efectelor de matrice provocate de sol, trebuie să se includă o probă oarbă care să conțină sistemul sol + soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără substanța testată).

Metodele analitice care se pot utiliza pentru măsurători de sorbție includ cromatografia gaz-lichid (CGL), cromatografia lichidă de înaltă performanță (CLIP), spectrometria (de exemplu, GC/spectrometrie de masă, CLIP/spectrometrie de masă) și numărătoare în scintilație lichidă (pentru substanțele marcate radioactiv). Indiferent de metoda analitică utilizată, se consideră că este bine, dacă recuperările se situează între 90 % și 110 % din valoarea nominală. Pentru a permite detectarea și evaluarea după ce a avut loc partiția, este necesar ca limitele de detecție ale metodei analitice să fie cu cel puțin două ordine de mărime mai mici decât concentrația nominală.

Caracteristicile și limitele de detecție ale metodei analitice disponibile pentru efectuarea studiilor de adsorbție joacă un rol important în stabilirea condițiilor de testare și în întreaga desfășurare a încercării. Metoda urmează o cale experimentală generală și oferă recomandări și orientare pentru alte soluții, dacă există posibilitatea impunerii unor restricții datorită metodei analitice și dotării laboratorului.

1.8.2. **Selectarea raporturilor optime sol/soluție**

Selectarea raporturilor optime sol/soluție pentru studiile se sorbție depinde de coeficientul de distribuție K_d și de gradul relativ al adsorbției dorite. Modificarea concentrației substanței în soluție determină acuratețea statistică a măsurătorii, datorită formei ecuației pentru adsorbție și limitei de detecție a metodologiei analitice, în determinarea concentrației substanței chimice în soluție. Prin urmare, în practica generală, este util să se stabilească câteva raporturi fixe, pentru care procentul adsorbit să fie mai mare de 20 % și de preferință > 50 % (62), având grijă în același timp să se mențină o concentrație suficient de mare a substanței încercate în fază apoasă, pentru a fi măsurată cu acuratețe. Acest lucru este deosebit de important pentru cantitățile mari, în procente, adsorbite.

Un procedeu comod de selectare a raporturilor optime sol/apă constă în estimarea valorii K_d fie prin studii preliminare, fie prin tehnici de estimare stabilite (apendicele 3). Apoi, selectarea unui raport optim se poate realiza cu ajutorul reprezentării grafice a raportului sol/soluție funcție de K_d pentru procente stabilite ale adsorbției (fig. 1). În reprezentarea grafică menționată, se consideră că ecuația de adsorbție este lineară (1). Relația aplicabilă se obține printr-o ecuație de rearanjare (4) a K_d sub forma ecuației (1):

$$\frac{V_0}{m_{sol}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(ec)} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

(1) $C_s^{ads}(ec) = K_d \cdot C_{ap}^{ads}(ec)$

sau sub forma sa logaritmică, considerând că $R = m_{sol}/V_0$ și $A_{ec}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{ec}\%/100)}{(1 - A_{ec}\%/100)}\right] \quad (2)$$

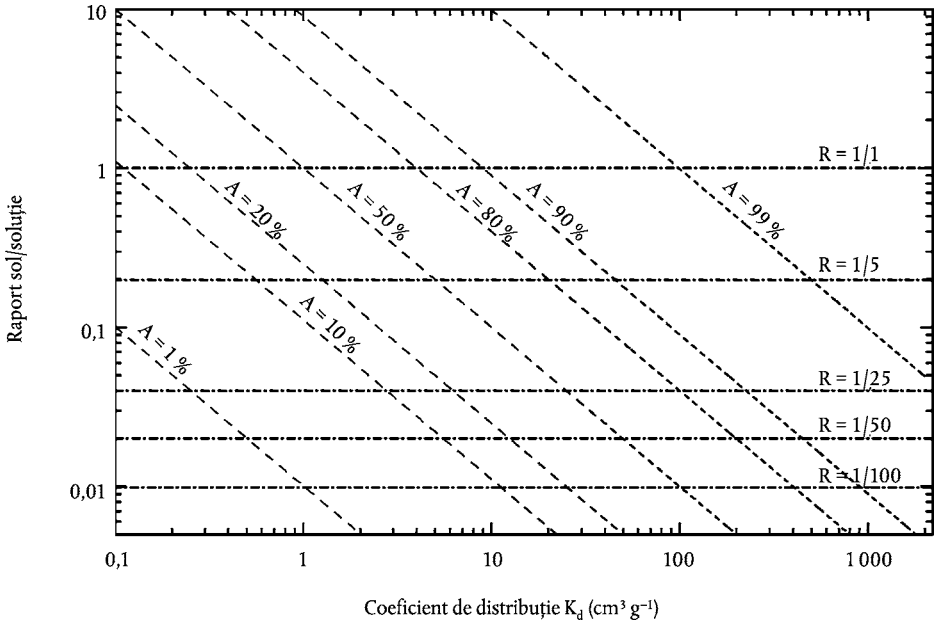


Fig. 1. Relația dintre raporturile sol/soluție și K_d la diferite procente de substanță testată adsorbită

Figura 1 prezintă raporturile sol/soluție în funcție de K_d pentru diferite valori ale adsorbției. De exemplu, pentru un raport sol/soluție de 1:5 și o valoare a K_d de 20, ar avea loc o adsorbție de 80 %. Pentru a obține o adsorbție de 50 % pentru aceeași valoare a K_d, trebuie să se utilizeze un raport de 1:25. Acest procedeu pentru selectarea raporturilor optime sol/soluție oferă persoanei care efectuează studiul flexibilitatea de a satisface necesitățile experimentale.

Zonele care sunt mai greu de rezolvat sunt cele în care substanța chimică este puternic sau foarte puțin adsorbită. Dacă se produce o adsorbție slabă, se recomandă un raport sol/soluție de 1:1, deși s-ar putea ca pentru unele tipuri de soluri foarte organice să fie necesare raporturi mai mici pentru a obține un mâl. La metodologia analitică, trebuie să se acorde o atenție deosebită la măsurarea modificărilor mici ale concentrației soluției; în caz contrar, măsurarea adsorbției nu va fi exactă. Pe de altă parte, la valori foarte mari ale coeficienților de distribuție K_d, se poate merge până la un raport sol/soluție de 1/100 pentru a lăsa o cantitate importantă de substanță chimică în soluție. Cu toate acestea, trebuie mare grijă pentru asigurarea unei amestecări bune și sistemul trebuie lăsat un timp suficient pentru stabilirea echilibrului. Un alt procedeu utilizat pentru rezolvarea cazurilor extreme de acest tip, atunci când nu există o metodologie analitică specifică, constă în estimarea valorii K_d cu ajutorul unor procedee de estimare, de exemplu, cu ajutorul valorilor P_{oa} (apendicele 3). Acesta ar putea să fie util, în special pentru substanțele chimice puțin adsorbite/polare, cu $P_{oa} < 20$ și pentru substanțele chimice lipofile/care se adsorb puternic, cu $P_{oa} > 10^4$.

1.9. REALIZAREA ÎNCERCĂRII

1.9.1. **Condiții experimentale**

Toate încercările se realizează la temperatura ambiantă și, dacă este posibil, la o temperatură constantă între 20 °C și 25 °C.

Condițiile de centrifugare trebuie să permită eliminarea particulelor mai mari de 0,2 µm din soluție. Valoarea menționată activează particulele de cele mai mici dimensiuni care sunt considerate particule solide și reprezintă limita dintre particulele solide și coloidale. O orientare asupra modului de determinare a condițiilor de centrifugare se prezintă în apendicele 4.

Dacă dispozitivele de centrifugare nu pot să garanteze eliminarea particulelor mai mari de 0,2 µm, se poate utiliza o combinație de centrifugare cu filtrare, cu filtre de 0,2 µm. Filtrele de acest tip ar trebui realizate dintr-un material inert potrivit pentru a evita pierderile de substanță testată pe acestea. În orice caz, trebuie dovedit că nu se produc pierderi de substanță testată în timpul filtrării.

1.9.2. **Etapa 1 - Studiu preliminar**

Scopul realizării unui studiu preliminar a fost deja prezentat la punctul „Domeniu de aplicare". O orientare privind inițierea unei încercări de acest tip se prezintă în experimentul propus în continuare.

1.9.2.1. *Selectarea raporturilor optime sol/soluție*

Se utilizează două tipuri de soluri și trei raporturi sol/soluție (șase probe). Un tip de sol are conținut mare de carbon organic și conținut mic de argilă și celălalt are conținut mic de carbon organic și conținut mare de argilă. Se propun următoarele raporturi sol/soluție:

— 50 g sol și 50 cm^3 soluție apoasă de substanță testată (raport 1/1);

— 10 g sol și 50 cm^3 soluție apoasă de substanță testată (raport 1/5);

— 2 g sol și 50 cm^3 soluție apoasă de substanță testată (raport 1/25).

Cantitatea minimă de sol pe care se poate efectua testarea depinde de dotările din laborator și de performanța metodelor analitice utilizate. Cu toate acestea, se recomandă să se utilizeze cel puțin 1 g și, de preferință, 2 g, pentru a obține rezultate credibile în urma încercărilor.

O probă martor care conține numai substanța testată în soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără sol) se supune unor etape precis identice cu cele ale sistemelor studiate, pentru a verifica stabilitatea substanței încercate în soluție de $CaCl_2$ și posibilitatea adsorbției acesteia pe suprafețele vaselor experimentale.

O probă oarbă pentru fiecare sol, care conține aceeași cantitate de sol și un volum total de 50 cm^3 de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără substanța testată) se supune aceluiași procedeu de testare. Aceasta reprezintă principalul control în timpul analizei pentru detectarea substanțelor care interferează sau a solurilor contaminate.

Toate încercările, inclusiv cele cu probă martor și probă oarbă, se realizează cel puțin de două ori. Numărul total de probe care trebuie pregătite pentru studiu se poate calcula ținând seama de metodologia care va fi urmată.

Metodele pentru studiul preliminar și studiul principal sunt, în general, aceleași, excepțiile fiind menționate, dacă este cazul.

Probele de sol uscate în aer se aduc la echilibru prin agitare cu un volum minim de 45 cm^3 de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M peste noapte (12 h) înaintea zilei în care se efectuează testarea. Apoi, se adaugă un volum determinat din soluția mamă a substanței încercate pentru a aduce volumul final la 50 cm^3. Volumul respectiv de soluție mamă adăugat: (a) nu trebuie să fie mai mare de 10 % din volumul final de 50 cm^3 de fază apoasă pentru a modifica cât se poate de puțin natura soluției de prestabilire a echilibrului; (b) trebuie să dea, de preferință, o concentrație inițială a substanței încercate în contact cu solul (C_0) cu cel puțin două ordine de mărime mai mare decât limita de detecție a metodei analitice; pragul menționat asigură posibilitatea de a efectua măsurători exacte chiar și atunci când se produc adsorbții puternice (> 90 %) și de determinare a izotermelor de adsorbție. Se recomandă, dacă este posibil, ca și concentrația inițială a substanței (C_0) să nu fie mai mare decât jumătate din limita de solubilitate a acesteia.

În continuare se prezintă un exemplu de mod de calcul al concentrației soluției mamă (C_{sm}). Se consideră o limită de detecție de 0,01 μg cm^{-3} și o adsorbție de 90 %; astfel, concentrația inițială a substanței încercate în contact cu solul este, de preferință, de 1 μg cm^{-3} (cu două ordine de mărime mai mare decât limita de detecție). Considerând că se adaugă volum maxim recomandat de soluție mamă, adică 5-45 cm^3 soluție de echilibrare de $CaCl_2$ 0,01 M (= 10 % din soluția mamă până la 50 cm^3 volumul total al fazei apoase), concentrația soluției mamă este de 10 μg cm^{-3}; aceasta este cu trei ordine de mărime mai mare decât limita de detecție a metodei analitice.

Se măsoară valoarea pH-ului fazei apoase înainte și după contactul cu solul, deoarece joacă un rol important în întregul proces de adsorbție, în special pentru substanțele ionizabile.

Amestecul se agită până la stabilirea echilibrului de adsorbție. Momentul stabilirii echilibrului în sol variază în mare măsură, în funcție de substanța chimică și de sol; în general, este suficient un timp de 24 h (77). În studiul preliminar, probele se pot colecta la anumite intervale de timp din cele 48 de ore de amestecare (de exemplu, la 4, 8, 24, 48 h). Cu toate acestea, momentele în care se fac determinările se stabilesc și în funcție de programul de lucru al laboratorului.

Există două opțiuni pentru analiza substanței încercate în soluție apoasă: (a) metoda paralelă și (b) metoda în serie. Trebuie să se sublinieze că, deși metoda paralelă este mai incomodă din punct de vedere experimental, tratarea matematică a rezultatelor este mai simplă (apendicele 5). Cu toate acestea, alegerea metodologiei de urmat rămâne la latitudinea cercetătorului care trebuie să ia în considerare dotarea și resursele de care dispune laboratorul.

(a) Metoda paralelă: se pregătesc probe cu același raport sol/soluție, în număr egal cu intervalele de timp la care se dorește să se studieze cinetica adsorbției. După centrifugare și dacă se dorește filtrarea, se recuperează faza apoasă din prima eprubetă cât se poate de complet și se măsoară după, de exemplu, 4 h, cea din a doua eprubetă după 8 h, cea din a treia după 24 h etc.

(b) Metoda în serie: se prepară doar o probă dublă pentru fiecare raport sol/soluție. La intervale determinate de timp, amestecul se supune centrifugării pentru separarea fazelor. Se analizează imediat un mic alicot din faza apoasă pentru determinarea substanței încercate; apoi testarea continuă cu amestecul inițial. Dacă se aplică filtrarea după centrifugare, laboratorul trebuie să dispună de dispozitivele pentru realizarea filtrării unor mici alicoți din soluția apoasă. Se recomandă ca volumul total al alicoților luați să nu fie mai mare de 1 % din volumul total al soluției, pentru nu a modifica semnificativ raportul sol/soluție și pentru a reduce masa substanței dizolvate care poate să fie adsorbită în timpul încercării.

Se calculează adsorbția A_{t_i}, în procente, la fiecare moment (t_i) în funcție de concentrația inițială nominală și concentrația măsurată în momentul prelevării probei (t_i), se corectează cu valoarea probei oarbe. Se reprezintă grafic A_{t^i} funcție de timp (apendicele 5 figura 1) pentru a estima stabilirea palierului de echilibru ([1]). Se mai calculează valoarea K_d la echilibru. În funcție de această valoare K_d, se selectează raporturile optime sol/soluție din fig. 1, astfel încât adsorbția în procente să ajungă la mai mult de 20 % și, de preferință, la > 50 % (61). Toate ecuațiile și principiile aplicabile se prezintă la punctul „Rezultatele și raportarea acestora" și în apendicele 5.

1.9.2.2. *Determinarea momentului de stabilire a echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru*

După cum s-a menționat deja, reprezentările grafice ale A_{t_i} sau C_{ap}^{ads} în funcție de timp permit estimarea stabilirii echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru. Figurile 1 și 2 din apendicele 5 prezintă exemple de asemenea reprezentări grafice. Momentul de stabilire a echilibrului reprezintă nevoia sistemului de a ajunge la un palier.

Dacă, pentru un anumit sol, nu se găsește un palier, ci o creștere constantă, acest lucru se poate datora unor factori care complică situația, cum ar fi biodegradarea sau difuzia lentă. Biodegradarea se poate pune în evidență prin repetarea încercării cu o probă sterilizată de sol. Dacă nici în acest caz nu se obține un palier, cercetătorul trebuie să caute alte fenomene care ar putea să fie implicate în studiile sale specifice; acest lucru se poate realiza prin modificări corespunzătoare ale condițiilor experimentale (temperatură, timpi de agitare, raporturi sol/soluție). Rămâne la latitudinea cercetătorului să decidă dacă să continue procedeul de testare, în ciuda unui posibil eșec în stabilirea echilibrului.

1.9.2.3. *Adsorbția pe suprafața vasului experimental și stabilitatea substanței încercate*

Se pot obține date privind adsorbția substanței încercate pe suprafața vaselor experimentale, precum și stabilitatea acesteia, prin analizarea probelor martor. Dacă se observă o epuizare mai mare decât eroarea standard a metodei analitice, se poate să fie implicată degradarea abiotică și adsorbția pe suprafața vasului experimental. Se poate face distincția dintre aceste două fenomene prin spălarea cu grijă a pereților vasului experimental cu un volum cunoscut dintr-un solvent potrivit și analizarea soluției de spălare pentru determinarea substanței încercate. Dacă nu se observă adsorbție pe suprafața vaselor experimentale, epuizarea indică instabilitatea abiotică a substanței încercate. Dacă se găsește adsorbție, este necesar ca vasul experimental să fie din alt material. Cu toate acestea, rezultatele încercării descrise anterior privind adsorbția pe suprafața vaselor experimentale nu pot fi extrapolate direct la testarea sol/soluție. Prezența solului va afecta adsorbția respectivă.

Se pot obține date suplimentare privind stabilitatea substanței încercate prin determinarea bilanțului de masă original în timp. Aceasta înseamnă că se analizează faza apoasă, extractele de sol și pereții vaselor experimentale pentru determinarea substanței încercate. Diferența dintre masa substanței chimice încercate adăugate și suma maselor substanței chimice încercate în faza apoasă, extractele de sol și de pe pereții vaselor experimentale este egală cu masa degradată și volatilizată și neextrasă. Pentru a determina bilanțul de masă, este necesar ca echilibrul de adsorbție să fi fost stabilit în timpul experimentării.

Bilanțul de masă se face pe ambele soluri și pentru un raport sol/soluție per sol care dă o epuizare de peste 20 % și, de preferință, > 50 % la echilibru. La terminarea încercării pentru găsirea raportului prin analiza ultimei probe de fază apoasă după 48 ore, fazele se separă prin centrifugare și, dacă se dorește, prin filtrare.

([1]) Reprezentările grafice ale concentrației substanței de încercat în fază apoasă (C_{ap}^{ads}) funcție de timp s-ar mai putea utiliza la estimarea atingerii palierului de echilibru (apendicele 5 figura 2).

Faza apoasă se recuperează atât cât este posibil și se adaugă solului un solvent de extracție potrivit (coeficientul de extracție de cel puțin 95 %) pentru extragerea substanței încercate. Se recomandă cel puțin două extracții succesive. Se determină cantitatea de substanță din extractele din sol și de pe pereții vaselor experimentale și se calculează bilanțul de masă (Rezultatele și prezentarea acestora, ecuația 10). Dacă acesta este mai mic de 90 %, se consideră că substanța testată este instabilă pe scara timpului de testare. Cu toate acestea, studiile se mai pot continua, ținând seama de instabilitatea substanței încercate; în cazul respectiv, se recomandă analizarea ambelor faze în studiul principal.

1.9.3. **Etapa 2 - Cinetica de adsorbție la o concentrație a substanței încercate**

Se utilizează cinci soluri, selectate din tabelul 1. Este avantajoasă includerea unora sau a tuturor solurilor utilizate în studiul preliminar, dacă este cazul, printre cele cinci soluri. În cazul respectiv, pentru solurile utilizate în studiul preliminar etapa 2 nu trebuie să se repete.

Momentul stabilirii echilibrului, raportul sol/soluție, greutatea probei de sol, volumul fazei apoase în contact cu solul și concentrația substanței încercate în soluție se aleg în funcție de rezultatele studiului preliminar. Determinarea se face de preferință după aproximativ 2, 4, 6, 8 (posibil și 10) și 24 h timp de contact; timpul de agitare se poate prelungi la maximum 48 h, dacă o substanță chimică necesită un timp mai îndelungat pentru stabilirea echilibrului în privința rezultatelor încercării pentru găsirea raportului. Cu toate acestea, momentele de efectuare a determinărilor se pot stabili cu îngăduință.

Fiecare testare (un sol și o soluție) se realizează cel puțin dublu pentru a permite estimarea variației rezultatelor. Pentru fiecare testare se pregătește o probă oarbă. Această conține solul și soluția de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată și având greutatea și respectiv volumul identice cu cele din testare. O probă martor care conține numai substanța testată în soluția de $CaCl_2$ 0,01 M (fără sol) se supune aceluiași procedeu de testare, servind drept garanție pentru situații neprevăzute.

Se calculează adsorbția în procente la fiecare moment A_{t_i} și interval de timp $A_{\Delta t_i}$(după necesități) și se reprezintă grafic funcție de timp. Se mai calculează coeficientul de distribuție K_d la echilibru, precum și coeficientul de adsorbție normalizat cu carbon organic K_{co} (pentru substanțele chimice organice nepolare).

Rezultatele determinării cineticii de adsorbție

Valoarea K_d linear este în general exactă pentru descrierea comportamentului de sorbție în sol (35) (78) și reprezintă o expresie a mobilității inerente a substanțelor chimice în sol. De exemplu, se consideră, în general, că substanțele chimice cu $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} sunt mobile calitativ. În mod similar, MacCall și colab. au elaborat un sistem de clasificare a mobilității în funcție de valorile K_{co} (16). În afară de acesta, există sisteme de clasificare a extracției prin spălare în funcție de relația dintre K_{co} și TD-50 ([1]) (32) (79).

De asemenea, conform studiilor de analiză a erorii (61), valorile K_d mai mici de 0,3 cm^3 g^{-1} nu se pot determina cu exactitate dintr-o scădere a concentrației în fază apoasă, chiar și atunci când se utilizează raportul sol/soluție cel mai favorabil (din punct de vedere al exactității), adică 1:1. În asemenea caz, se recomandă analiza ambelor faze, sol și soluție.

Referitor la observațiile anterioare, se recomandă ca studiul privind comportamentul de adsorbție a unei substanțe chimice în sol și posibila mobilitate a acesteia să fie continuat prin determinarea izotermelor de adsorbție Freundlich pentru sistemele respective, pentru care este posibilă o determinare exactă a K_d după protocolul de testare din prezenta metodă de testare. Este posibilă o determinarea exactă, dacă valoarea care rezultă prin amplificarea K_d cu raportul sol/soluție este > 0,3, când măsurătorile au la bază scăderea concentrației în faza apoasă (metoda indirectă) sau > 0,1, când se analizează ambele faze (metoda directă) (61).

1.9.4. **Etapa 3 - Izotermele de adsorbție și cinetica de desorbție/izotermele de desorbție**

1.9.4.1. *Izotermele de adsorbție*

Se utilizează cinci concentrații ale substanței încercate, care cuprind de preferință două ordine de mărime; în alegerea concentrațiilor respective, se ține seama de solubilitatea în apă și de concentrațiile în soluție apoasă rezultate la echilibru. Pe toată durata studiului se menține același raport sol/soluție. Testarea de adsorbție se realizează așa cum s-a descris anterior, cu singura diferență că faza apoasă se analizează doar o singură dată la timpul necesar pentru stabilirea echilibrului, cum s-a determinat mai înainte în etapa 2. Se determină concentrațiile la echilibru în soluție și se calculează cantitatea adsorbită din epuizarea

([1]) TD-50: timpul de degradare pentru 50 % din substanța de încercat.

substanței încercate în soluție sau prin metoda directă. Se reprezintă grafic masa adsorbită per unitatea de masă de sol funcție de concentrația la echilibru a substanței încercate (a se vedea Rezultatele și prezentarea acestora).

Rezultatele determinării izotermelor de adsorbție

Printre modelele matematice pentru adsorbție propuse până în prezent, izoterma lui Freundlich este una utilizată frecvent pentru descrierea procesului de adsorbție. Date mai detaliate privind interpretarea și importanța modelelor de adsorbție se prezintă în bibliografie (41) (45) (80) (81) (82).

Notă: Trebuie să se menționeze că este posibilă o comparare a valorilor K_F (coeficientul de adsorbție Freundlich) pentru diferite substanțe, dacă valorile K_F respective se exprimă în aceleași unități (83).

1.9.4.2. *Cinetica de desorbție*

Scopul prezentei încercări este de a cerceta dacă o substanță chimică este adsorbită reversibil sau ireversibil pe un sol. Aceste date sunt importante, deoarece procesul de desorbție joacă un rol important și în comportamentul unei substanțe chimice în solul din teren. În plus, datele de desorbție sunt date de intrare importante în modelarea pe calculator a simulărilor pentru extracția prin spălarea și scurgerea substanțelor dizolvate. Dacă se dorește un studiu de desorbție, se recomandă să se efectueze studiul descris în continuare pentru fiecare sistem pentru care a fost posibilă o determinare exactă a K_d în testarea precedentă pentru determinarea cineticii de adsorbție.

Ca și în cazul studiului cineticii de adsorbție, există două opțiuni pentru continuarea încercării pentru determinarea cineticii de desorbție: (a) metoda paralelă și (b) metoda în serie. Alegerea metodologiei de urmat rămâne la latitudinea cercetătorului care trebuie să țină seama de dotarea și resursele laboratorului.

(a) Metoda paralelă: pentru fiecare sol care se alege pentru continuarea studiului de desorbție, se pregătesc probe cu același raport sol/soluție, în număr egal cu numărul intervalelor de timp la care se dorește să se studieze cinetica de desorbție. Este preferabil să se utilizeze aceleași intervale de timp ca în testarea pentru determinarea cineticii de adsorbție; totuși, timpul total se poate prelungi, dacă este cazul, pentru ca în sistem să se stabilească echilibrul de desorbție. Pentru orice testare (un sol, o soluție) se pregătește o probă oarbă. Aceasta conține solul și soluția de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată și având greutatea și respectiv volumul identice cu cele din testare. Ca probă martor, substanța testată în soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără sol) se supune aceleași proceduri de testare. Toate amestecurile de sol cu soluție se agită până se stabilește echilibrul de adsorbție (după cum s-a stabilit anterior în etapa 2). Apoi, fazele se separă prin centrifugare și se îndepărtează fazele apoase cât se poate de mult. Volumul soluției îndepărtate se înlocuiește cu un volum egal de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată și noile amestecuri se agită din nou. Faza apoasă din prima eprubetă se recuperează cât se poate de mult și se măsoară după, de exemplu, 2 h, cea din a doua eprubetă după 4 h, cea din a treia după 6 h etc., până când se realizează echilibrul de desorbție.

(b) Metoda în serie: după testarea pentru determinarea cineticii de adsorbție, amestecul este supus centrifugării și se elimină faza apoasă cât se poate de mult. Volumul de soluție îndepărtat se înlocuiește cu un volum egal de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată. Noul amestec se agită până când se stabilește echilibrul de desorbție. În acest timp, la intervale egale, amestecul se supune centrifugării pentru separarea fazelor. Se analizează imediat un mic alicot de fază apoasă pentru determinarea substanței încercate; apoi, testarea continuă cu amestecul original. Volumul fiecărui alicot trebuie să fie mai mic de 1 % din volumul total. Se adaugă aceeași cantitate de soluție proaspătă de $CaCl_2$ 0,01 M la amestec pentru a menține raportul sol/soluție și se continuă agitarea până la următorul interval de timp.

Se calculează desorbția, în procente, la fiecare moment (D_{t_i}) și interval de timp ($D_{\Delta t_i}$) (în funcție de necesitățile studiului) și se reprezintă grafic funcție de timp. Se mai calculează coeficientul de desorbție K_{des} la echilibru. Toate ecuațiile aplicabile sunt date la punctul „Rezultatele și prezentarea acestora” și în apendicele 5.

Rezultatele încercării pentru determinarea cineticii de desorbție

Reprezentările grafice obișnuite ale desorbției D_{t_i} și adsorbției A_{t_i}, în procente, funcție de timp, permit determinarea reversibilității procesului de adsorbție. Dacă echilibrul de desorbție se atinge chiar într-un timp dublu față de timpul necesar pentru atingerea echilibrului de adsorbție și desorbția totală este mai mare decât 75 % din cantitatea adsorbită, se consideră că adsorbția este reversibilă.

1.9.4.3. *Izotermele de desorbție*

Se determină izotermele de desorbție Freundlich pe solurile utilizate în testarea pentru izotermele de adsorbție. Testarea de desorbție se efectuează conform descrierii de la punctul „Cinetica de desorbție", cu singura diferență că faza apoasă se analizează doar o singură dată, la echilibrul de desorbție. Se calculează cantitatea de substanță testată desorbită. Se reprezintă grafic conținutul de substanță testată, care rămâne adsorbită pe sol la atingerea echilibrul de desorbție, în funcție de concentrația la echilibru a substanței încercate în soluție (a se vedea Rezultatele și prezentarea acestora și apendicele 5).

2. REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA

Rezultatele analitice se prezintă sub formă de tabel (a se vedea apendicele 6). Se prezintă măsurătorile individuale și mediile calculate. Se prezintă reprezentările grafice ale izotermelor de adsorbție. Calculele se fac conform metodologiei descrise în continuare.

În sensul prezentei încercări, se consideră că greutatea pentru 1 cm^3 de soluție apoasă este 1 g. Raportul sol/soluție se poate exprima în unități de greutate/greutate sau greutate/volum cu aceeași cifră.

2.1. ADSORBȚIA

Adsorbția (A_{t_i}) se definește ca fiind cantitatea de substanță, în procente, adsorbită pe sol raportată la cantitatea prezentă la începutul încercării, în condițiile experimentale. Dacă substanța testată este stabilă și nu se adsoarbe într-o măsură importantă pe pereții vasului experimental, se calculează A_{t_i} pentru fiecare moment t_i, conform ecuației:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

unde:

A_{t_i} = adsorbția la momentul t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa substanței încercate adsorbite pe sol la momentul t_i (μg);

m_0 = masa substanței încercate din eprubetă, la începutul încercării (μg).

Date detaliate privind modul de calcul al adsorbției A_{t_i}, în procente, pentru metodele paralelă și în serie se prezintă în apendicele 5.

Coeficientul de distribuție K_d este raportul dintre conținutul de substanță din faza de sol și concentrația masică de substanță în soluția apoasă, în condițiile experimentale, când se stabilește echilibrul de adsorbție.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(ec)}{C_{ap}^{ads}(ec)} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{ap}^{ads}(ec)} \frac{V_0}{m_{sol}} \left(cm^3\ g^{-1}\right) \quad (4)$$

unde:

$C_s^{ads}(ec)$ = conținutul de substanță adsorbită pe sol la echilibrul de adsorbție (μg g^{-1});

$C_{ap}^{ads}(ec)$ = concentrația masică a substanței în faza apoasă la echilibrul de adsorbție (μg cm^{-3}). Concentrația respectivă se determină analitic ținând seama de valorile date de probele oarbe;

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței încercate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg);

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței încercate în soluție la echilibrul de adsorbție (μg);

m_{sol} = cantitatea de fază de sol, exprimată în masă uscată de sol (g),

V_0 = volumul inițial al fazei apoase în contact cu solul (cm^3).

Relația dintre A_{ec} și K_d este dată de:

$$K_d = \frac{A_{ec}}{100 - A_{ec}} \frac{V_0}{m_{sol}} \left(cm^3\ g^{-1}\right) \quad (5)$$

unde:

A_{ec} = adsorbția la echilibru, %.

Coeficientul de adsorbție normalizată a carbonului organic K_{co} reprezintă relația dintre coeficientul de distribuție K_d și conținutul de carbon organic din proba de sol:

$$K_{co} = K_d \cdot \frac{100}{\%co} \left(cm^3\ g^{-1}\right) \quad (6)$$

unde:

%co = procentajul de carbon organic în proba de sol (g^{-1})

Coeficientul K_{co} reprezintă o valoare unică ce caracterizează partiția în principal a substanțelor chimice organice nepolare între carbonul organic din sol sau sediment și apă. Adsorbția substanțelor chimice respective este corelată cu conținutul organic al solidului adsorbant (7); astfel, valorile K_{co} depind de caracteristicile specifice ale fracțiilor humice care au o capacitate de sorbție foarte diferită, datorită diferențelor de origine, geneză etc.

2.1.1. **Izoterme de adsorbție**

Ecuația izotermelor de adsorbție Freundlich reprezintă relația dintre cantitatea de substanță testată adsorbită și concentrația substanței încercate în soluție la echilibru (ecuația 8).

Rezultatele sunt tratate ca la „Adsorbție" și, pentru fiecare eprubetă, se calculează conținutul de substanță testată adsorbită pe sol după testarea de adsorbție [$C_s^{ads}(ec)$, indicată în altă parte ca x/m]. Se consideră că echilibrul a fost stabilit și că $C_s^{ads}(ec)$ reprezintă valoarea la echilibru:

$$C_s^{ads}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{sol}} = \frac{[C_0 - C_{ap}^{ads}(ec)] \cdot V_0}{m_{sol}} \left(\mu g\ g^{-1}\right) \quad (7)$$

Ecuația de adsorbție Freundlich este prezentată la (8):

$$C_s^{ads}(ec) = K_F^{ads} \cdot C_{ap}^{ads}(ec)^{1/n} \left(\mu g\ g^{-1}\right) \quad (8)$$

sau sub formă lineară:

$$\log C_s^{ads}(ec) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{ap}^{ads}(ec) \quad (9)$$

unde:

K_F^{ads} = coeficientul de adsorbție Freundlich; se exprimă în $cm^3 g^{-1}$, numai dacă 1/n = 1; în toate celelalte cazuri, panta 1/n se introduce în dimensiunea $K_F^{ads}\left(\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}\ g^{-1}\right)$

n = constanta de regresie, 1/n variază în general între 0,7-1,0, ceea ce indică faptul că rezultatele privind sorbția sunt în mod frecvent ușor neliniare.

Ecuațiile (8) și (9) sunt reprezentate grafic și se calculează valorile pentru K_F^{ads} și 1/n prin analiza de regresie cu ajutorul ecuației 9. Se mai calculează coeficientul de corelare r^2 al ecuației logaritmice. În figura 2 se prezintă un exemplu al acestor reprezentări grafice.

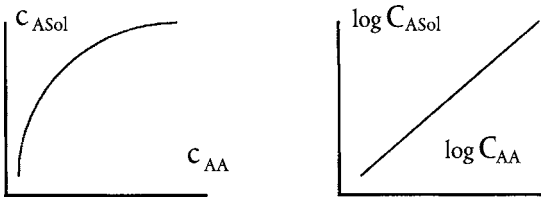


Fig. 2. Reprezentarea grafică a ecuației Freundlich, normală și linearizată

2.1.2. **Bilanțul de masă**

Bilanțul de masă (BM) se definește ca procentul de substanță care se poate recupera analitic după o testare de adsorbție în funcție de cantitatea de substanță la începutul încercării.

Prelucrarea rezultatelor va fi diferită, dacă solventul este complet miscibil cu apa. În cazul solventului miscibil cu apa, se poate aplica prelucrarea datelor descrise la „Desorbție" pentru determinarea cantității de substanță recuperată prin extracția solventului. Dacă solventul este mai puțin miscibil cu apa, trebuie să se determine cantitatea recuperată.

Bilanțul de masă BM pentru adsorbție se calculează după cum urmează: se consideră că termenul (m_E) corespunde sumei maselor substanței chimice încercate extrase din sol și de pe suprafața vasului experimental cu un solvent organic:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{ap}^{ads}(ec) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

unde:

BM = bilanțul de masă (%)

m_E = masa totală a substanței încercate extrase din sol și de pe pereții vasului experimental în două etape (μg)

C_0 = concentrația inițială în unități de masă a soluției experimentale în contact cu solul (μg cm^{-3})

V_{rec} = volumul supernatantului recuperat după echilibrul de adsorbție (cm^{-3})

2.2. DESORBȚIA

Desorbția (D) se definește ca fiind cantitatea de substanță testată desorbită, exprimată în procente, corelată cu cantitatea de substanță adsorbită anterior, în condițiile de testare:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100 \ (\%) \quad (11)$$

unde:

D_{t_i} = desorbția la momentul t_i (%)

$m_{ap}^{des}(t_i)$ = masa substanței încercate desorbite din sol la momentul t_i(μg)

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței încercate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg)

Informații detaliate privind modul de calcul a desorbției D_{t_i}, în procente, pentru metodele paralelă și în serie se prezintă în apendicele 5.

Coeficientul de desorbție aparentă (K_{des}) este, în condițiile de testare, raportul dintre conținutul de substanță ce rămâne în faza de sol și concentrația masică a substanței desorbite în soluție apoasă, când se realizează echilibrul de desorbție.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)}{m_{ap}^{des}(ec)} \frac{V_T}{m_{sol}} \left(cm^3 \ g^{-1}\right) \quad (12)$$

unde:

K_{des} = coeficientul de desorbție (cm^3 g^{-1})

$m_{ap}^{des}(ec)$ = masa totală a substanței încercate desorbite din sol la echilibrul de desorbție (μg)

V_T = volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul determinării cineticii de desorbție (cm^3)

Modul de calculare a $m_{ap}^{des}(ec)$ este prezentat în apendicele 5 la punctul „Desorbție".

Observație:

Dacă testarea anterioară de adsorbție s-a realizat prin metoda paralelă, volumul V_T din ecuația 12 se consideră egal cu V_0.

2.2.1. **Izotermele de desorbție**

Ecuația pentru izotermele de desorbție Freundlich reprezintă corelația dintre conținutul de substanță testată care rămâne adsorbită pe sol și concentrația de substanță testată în soluție la echilibrul de desorbție (ecuația 16).

Pentru fiecare eprubetă, se calculează conținutul de substanță ce rămâne adsorbită pe sol la echilibrul de desorbție cu formula următoare:

$$C_s^{des}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)}{m_{sol}} \left(\mu g\ g^{-1}\right) \quad (13)$$

unde: se definește prin relația:

$$m_{ap}^{des}(ec) = m_m^{des}(ec) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{ap}^{A}\ (\mu g) \quad (14)$$

$C_s^{des}(ec)$ = conținutul de substanță testată ce rămâne adsorbită pe sol la echilibrul de desorbție ($\mu g\ g^{-1}$)

$m_m^{des}(ec)$ = masa substanței determinate analitic în fază apoasă la echilibrul de desorbție (μg)

m_{ap}^{A} = masa substanței încercate rămase de la echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$m_{ap}^{des}(ec)$ = masa substanței din soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

$$m_{ap}^{A} = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volumul de soluție luat din eprubetă pentru determinarea substanței încercate, la echilibrul de desorbție (cm^3)

V_R = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

Ecuația de desorbție Freundlich este prezentată la (16):

$$C_s^{des}(ec) = K_F^{des} \cdot C_{ap}^{des}(ec)^{1/n} \left(\mu g\ g^{-1}\right) \quad (16)$$

sau în forma lineară:

$$\log C_s^{des}(ec) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{ap}^{des}(ec) \quad (17)$$

unde:

K_F^{des} = coeficientul de desorbție Freundlich

n = constanta de regresie

$C_{ap}^{des}(ec)$ = concentrația masică de substanță în fază apoasă la echilibrul de desorbție ($\mu g\ cm^{-3}$)

Ecuațiile 16 și 17 se pot reprezenta grafic și se calculează valorile pentru K_F^{des} și 1/n prin analiza de regresie cu ajutorul ecuației 17.

Observație:

Dacă exponentul 1/n al adsorbției sau desorbției Freundlich este egal cu 1, constantele de legătură (K_F^{ads} și K_F^{des}) vor fi egale cu constantele de adsorbție sau desorbție la echilibru (K_d și respectiv K_{des}) și reprezentările grafice ale C_s funcție de C_{ap} vor fi lineare. Dacă exponenții nu sunt egali cu 1, reprezentările grafice ale C_s funcție de C_{ap} vor fi nelineare și constantele de adsorbție și desorbție vor varia în lungul izotermelor.

2.2.2. **Raportul încercării**

Raportul încercării trebuie să conțină următoarele date:

— Identificarea completă a probelor de sol utilizate, care include:

  — definirea geografică a locului (latitudine, longitudine);

  — data prelevării probelor;

  — destinația terenului (de exemplu, sol agricol, forestier etc.);

  — adâncimea prelevării probelor;

  — conținutul de nisip/mâl/argilă;

  — valorile pH-ului (în soluție de $CaCl_2$ 0,01 M);

  — conținutul de carbon organic;

  — conținutul de substanțe organice;

  — conținutul de azot;

  — raportul C/N;

  — capacitatea de schimb de cationi (mmol/kg);

  — toate datele referitoare la colectarea și depozitarea probelor de sol;

  — dacă este cazul, toate datele relevante pentru interpretarea adsorbției/desorbției substanței încercate;

  — specificarea metodelor utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;

— date privind substanța testată, dacă este cazul;

— temperatura la care s-a efectuat testarea;

— condițiile de centrifugare;

— metoda analitică utilizată pentru determinarea substanței încercate;

— justificarea oricărei utilizări a agentului de solubilizare pentru pregătirea soluției mamă a substanței încercate;

— explicarea corecțiilor făcute în calcule, dacă este relevant;

— rezultatele conform formularului (apendicele 6) și prezentările grafice;

— toate datele și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor încercării.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, 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, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-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 pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (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), pp. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., 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, pp. 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, pp. 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. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

(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, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)- 1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 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, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V. H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 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, pp. 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, pp. 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), pp. 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, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, pp. 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, pp. 572-576.

(37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, pp. 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, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, pp. 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, pp. 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: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in 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: pp. 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, pp. 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 Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; 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), 11th 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.

(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, pp. 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., pp. 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, pp. 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, Brussels, 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, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ. Qual., 10(3), pp. 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), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 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), pp. 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.

(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, pp. 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, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(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), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(75) Kördel W., 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), pp. 1373-1384.

(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.

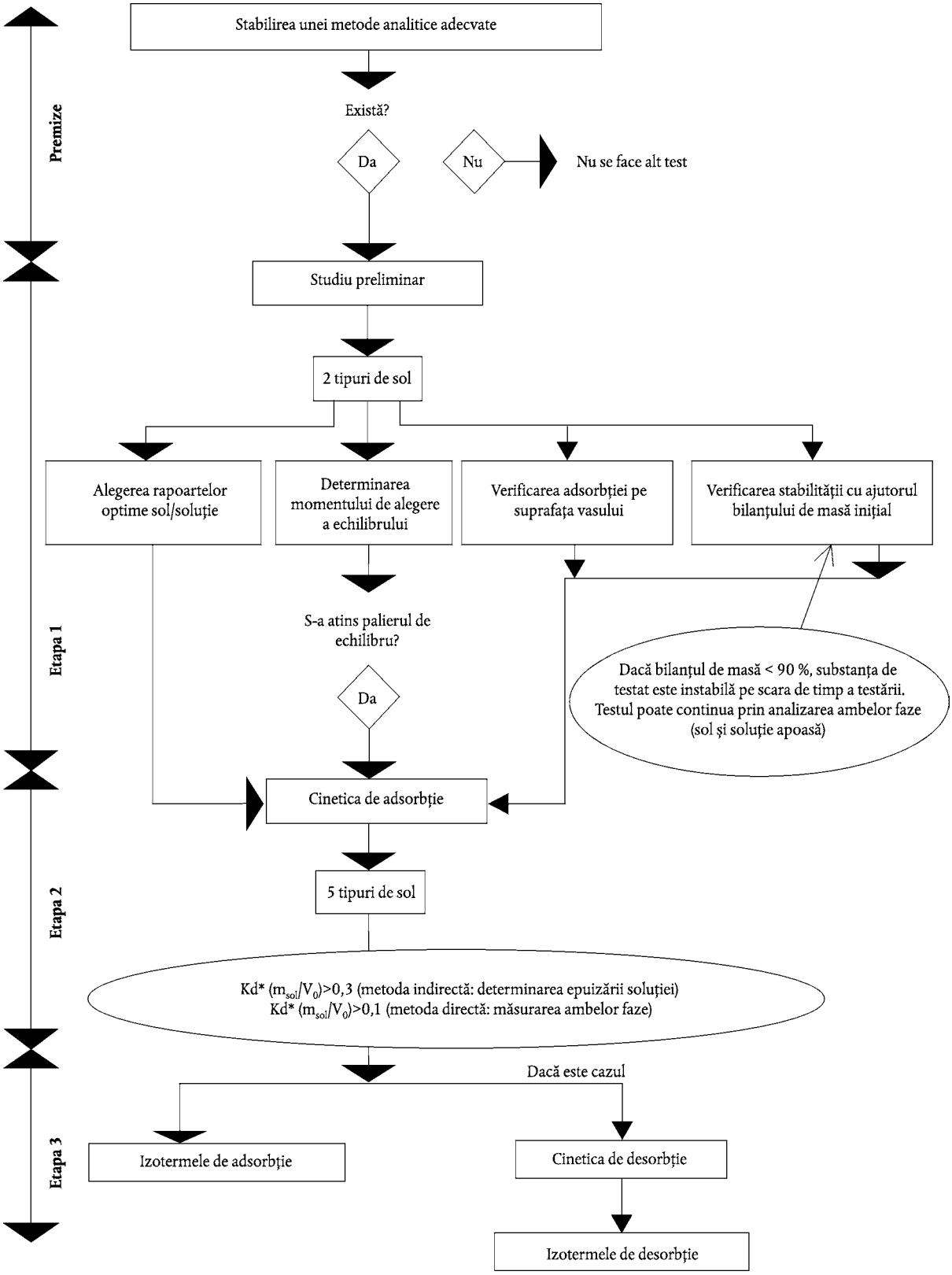
(83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation", Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

(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, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

APENDICELE 1

PROTOCOLUL TESTULUI



APENDICELE 2

INFLUENȚA PRECIZIEI METODEI ANALITICE ȘI A VARIAȚIEI CONCENTRAȚIEI ASUPRA PRECIZIEI REZULTATELOR PRIVIND ADSORBȚIA

Din tabelul prezentat în continuare (84), este evident că atunci când diferența dintre masa inițială (m_0 = 110 µg) și masa la echilibru [m_{ap}^{ads} (ec) = 100 µg] a substanței încercate în soluție este foarte mică, o eroare de 5 % la măsurarea concentrației la echilibru conduce la o eroare de 50 % în calculul masei de substanță adsorbită în sol [m_s^{ads} (ec)] și de 52,4 % în calculul K_d.

Cantitatea de sol m_{sol} = 10 g
Volumul soluției V_0 = 100 cm³

	m_{ap}^{ads} (ec) (µg)	C_{ap}^{ads} (ec) (µg cm^{-3})	R	m_s^{ads} (ec) * (µg)	C_s^{ads} (ec) * (µg g^{-1})	$R^{\ddagger}$	K_d *	$R^{\ddagger}$
	PENTRU A = 9 %							
m_0 = 110 µg sau C_0 = 1,100 µg/cm³	100	1,000	valoarea reală	10	1,00	valoarea reală	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,9 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PENTRU A = 55 %							
m_0 = 110 µg sau C_0 = 1,100 µg/cm³	50,0	0,500	valoarea reală	60,0	60,0	valoarea reală	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 %
	PENTRU A = 99 %							
m_0 = 110 µg sau C_0 = 1,100 µg/cm³	1,100	0,011	valoarea reală	108,9	10,89	valoarea reală	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 %

Unde:

$$*m_s^{ads}\ (ec) = m_0 - m_{ap}^{ads}\ (ec),\quad C_s^{ads}\ (ec) = \frac{\left[C_0 - C_{ap}^{ads}\ (ec)\right] V_0}{m_{estimat}},\quad K_d = \frac{m_s^{ads}\ (ec)}{m_{ap}^{ads}\ (ec)} \frac{V_0}{m_{estimat}}$$

m_s^{ads} (ec) = masa substanței încercate în faza de sol la echilibru, µg

m_{ap}^{ads} (ec) = masa substanței încercate în faza apoasă la echilibru, µg

C_s^{ads} (ec) = conținutul de substanță încercată în faza de sol la echilibru, µg g^{-1}

C_{ap}^{ads} (ec) = concentrația masică a substanței încercate în faza apoasă la echilibru, µg cm^{-} 3

R = eroarea analitică în determinarea m_{ap}^{ads} (ec)

$R^{\ddagger}$ = eroarea calculată datorită erorii analitice R.

APENDICELE 3

METODE DE ESTIMARE PENTRU K_d

1. Metodele de estimare permit estimarea K_d din corelațiile cu, de exemplu, valorile P_{oa} (12) (39) (63-68), datele privind solubilitatea apei (12) (19) (21) (39) (68-73) sau datele privind polaritatea, rezultate din aplicarea CLIP (cromatografia lichidă de înaltă performanță) la faza inversată (74-76). Conform celor prezentate în tabelele 1 și 2, K_{co} sau K_{so} se calculează din ecuațiile menționate și, apoi, K_d se calculează indirect din ecuațiile următoare:

$$K_{co} = K_d \cdot \frac{100}{\%co} \left(cm^3\ g^{-1}\right) \qquad K_{so} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%co} \left(cm^3\ g^{-1}\right)$$

2. Concepția corelațiilor prezentate are în vedere două ipoteze: (1) adsorbția și desorbția sunt influențate în principal de substanța organică din sol și (2) interacțiunile implicate sunt în principal nepolare. Ca urmare, corelațiile de acest tip; (1) nu se pot aplica sau se pot aplica într-o anumită măsură la substanțele polare și (2) nu se pot aplica pentru un conținut foarte mic de substanță organică în sol (12). În afară de aceasta, deși s-au găsit corelații satisfăcătoare între P_{oa} și adsorbție (19), nu se poate spune același lucru pentru relația dintre solubilitatea apei și gradul de adsorbție (19) (21); până în prezent, studiile sunt foarte contradictorii.

3. În tabelele 1 și 2 se prezintă câteva exemple de corelații între coeficientul de adsorbție și coeficientul de partiție octanol-apă și respectiv solubilitatea în apă.

Tabelul 1. Exemple de corelație între coeficientul de distribuție a adsorbției și coeficientul de partiție octanol-apă; pentru alte exemple (12) (68)

Substanțe	Corelații	Autori
Urei substituite	$\log K_{so} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{oa}$	Briggs (1981) (39)
Clorurate aromate	$\log K_{co} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{oa}$	Chiou și colab. (1983) (65)
Diferite pesticide	$\log K_{so} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{oa}$	Gerstl și Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarburi aromate	$\log K_{co} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{oa}$	Vowles și Mantoura (1987) (67)

Tabelul 21. Exemple de corelație între coeficientul de distribuție a adsorbției și solubilitatea în apă; pentru alte exemple a se vedea (68) (69).

Substanțe	Corelații	Autori
Diferite pesticide	$\log K_{so} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_a$	Gerstl și Mingelgrin (1984) (66)
Substanțe clorurate aromate, alifatice	$\log K_{so} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_a$	Chiou și colab. (1979) (70)
α-naftol	$\log K_{co} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_a$	Hasset și colab. (1981) (71)
Substanțe aromate, alifatice ciclice	$\log K_{co} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_a - 0{,}00953 (mp - 25)$	Karickhoff (1981) (72)
Compuși diverși	$\log K_{so} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_a$	Moreale van Blade (1982) (73)

APENDICELE 4

CALCULE PENTRU STABILIREA CONDIȚIILOR DE CENTRIFUGARE

1. Timpul de centrifugare se obține cu formula următoare, considerând că particulele sunt sferice:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{ap})}\right] \ln\left({}^{R_b}/_{R_t}\right) \quad (1)$$

Pentru simplificare, toți parametrii se exprimă în unități non-SI (g, cm).

unde:

ω = viteza rotațională (= 2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = rotații pe minut

η = vâscozitatea soluției, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = raza particulei, cm

ρ_s = densitatea solului, g cm^{-3}

ρ_{ap} = densitatea soluției, g cm^{-3}

R_t = distanța de la centrul rotorului centrifugei până la suprafața soluției din eprubeta din centrifugă, cm

R_b = distanța de la centrul rotorului centrifugei până la fundul eprubetei din centrifugă, cm

$R_b - R_t$ = lungimea amestecului sol/soluție în eprubeta din centrifugă, cm

În practică, se utilizează dublul timpilor calculați pentru a asigura separarea completă.

2. Ecuația (1) se mai poate simplifica, dacă se consideră că vâscozitatea (η) și densitatea (ρ_{ap}) soluției sunt egale cu vâscozitatea și densitatea apei la 25 °C; astfel, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} și $\rho_{ap} = 1{,}0$ g cm^{-3}.

Atunci, timpul de centrifugare se obține cu ecuația (2):

$$t = \frac{3{,}7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Din ecuația (2) se vede că doi parametri sunt importanți pentru stabilirea condițiilor de centrifugare, adică timpul (t) și viteza (rpm), pentru a realiza separarea particulelor cu o anumită dimensiune (în cazul nostru cu raza de 0,1 μm): (1) densitatea solului și (2) lungimea amestecului în eprubeta din centrifugă ($R_b - R_t$), adică distanța parcursă de particula de sol de la suprafața soluției până la fundul eprubetei; evident, pentru un volum stabilit, lungimea amestecului din eprubetă va depinde de pătratul razei eprubetei din centrifugă.

4. Figura 1 prezintă variațiile timpului de centrifugare (t) funcție de viteza de centrifugare (rpm) la diferite densități ale solului (ρ_s) (Fig. 1a) și diferite lungimi ale amestecului din eprubetele din centrifugă (Fig. 1b). Din figura 1a, este evidentă influența densității solului; de exemplu, pentru o centrifugare clasică de 3 000 rpm, timpul de centrifugare este de aproximativ 240 min. pentru o densitate a solului de 1,2 g cm^{-3}, în timp ce pentru 2,0 g cm^{-3} este de 50 min. pentru o lungime a amestecului de 10 cm și de numai 7 min. pentru o lungime de 1 cm. Cu toate acestea, este important să se găsească o relație optimă între centrifugare, care necesită o lungime cât se poate mai mică și ușurința manipulării de către executant la separarea fazelor după centrifugare.

5. În plus, la stabilirea condițiilor experimentale pentru separarea fazelor sol/soluție, este important să se ia în considerație posibilitatea existenței unei a treia „pseudo-faze", coloizii. Particulele de acest tip, cu o dimensiune mai mică de 0,2 μm, pot să aibă un impact important asupra întregului mecanism de adsorbție a unei substanțe într-o suspensie de sol. Atunci când centrifugarea se realizează ca în descrierea anterioară, coloizii rămân în faza apoasă și se analizează împreună cu faza apoasă. Astfel, datele privind impactul acestora se pierd.

   Dacă laboratorul executant posedă dispozitive de ultracentrifugare sau ultrafiltrare, ar putea fi posibil un studiu mai aprofundat al fenomenului de adsorbție/desorbție al unei substanțe în sol, care să includă date privind adsorbția substanței pe coloizi. În cazul respectiv, se aplică o ultracentrifugare la 60 000 rpm sau o ultrafiltrare cu un filtru cu porozitatea de 100 000 Daltoni pentru separarea celor trei faze: sol, coloizi, soluție. Este necesar ca și protocolul încercării să se modifice corespunzător, pentru ca la toate cele trei faze să se analizeze substanța.

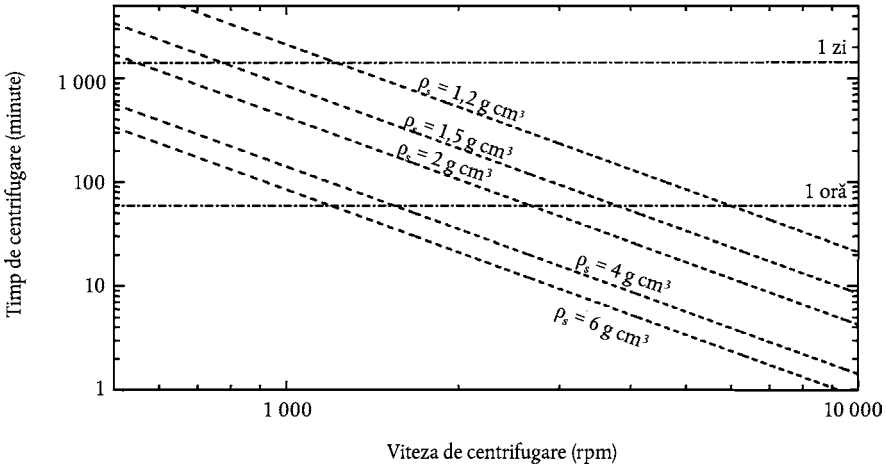


Fig. 1a. Variațiile timpului de centrifugare (t) funcție de viteza de centrifugare (rpm) pentru diferite densități ale solului (ρ_s). R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g s^{-1} cm^{-1}și ρ_{ap} = 1,0 g cm^{-3} la 25 °C.

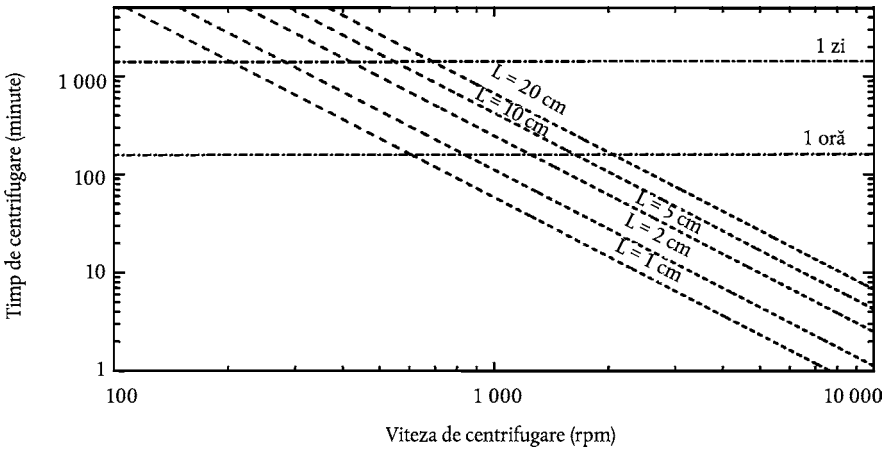
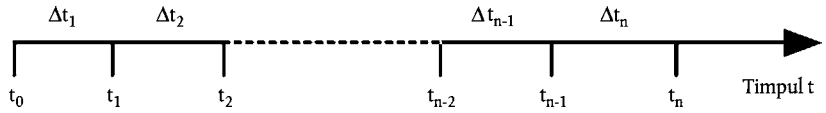


Fig. 1b. Variațiile timpului de centrifugare (t) funcție de viteza de centrifugare (rpm) pentru diferite lungimi ale amestecului în eprubeta din centrifugă ($R_b - R_t$) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{ap} = 1,0 g cm^{-3} la 25 °C și ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

APENDICELE 5

CALCULUL ADSORBȚIEI A (%) ȘI DESORBȚIEI D (%)

Diagrama timpului procedeului este:



În toate calculele se consideră să substanța testată este stabilă și nu se adsoarbe semnificativ pe pereții recipientului.

ADSORBȚIA A (A %)

(a) *Metoda paralelă*

Adsorbția, în procente, se calculează pentru fiecare eprubetă (i) și pentru fiecare moment (t_i), conform ecuației:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)\,(^1)$$

Termenii ecuației anterioare se pot calcula după cum urmează:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0\,(\mu g) \quad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0(\mu g) \quad (3)$$

unde:

A_{t_i} = adsorbția în procente (%) la momentul t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa substanței încercate pe sol la timpul t_i la care se efectuează analiza (μg)

m_0 = masa substanței încercate din eprubetă, la începutul încercării (μg)

C_0 = concentrația masică inițială a substanței din soluția de testare în contact cu solul (μg cm^{-3})

$C_{ap}^{ads}(t_i)$ = concentrația masică a substanței în faza apoasă la timpul t_i la care se realizează analiza (μg cm^{-3}); concentrația respectivă se determină analitic, ținând seama de valorile oferite de probele oarbe

V_0 = volumul inițial al soluției încercate în contact cu solul (cm^3).

Valorile adsorbției, în procente, A_{t_i} sau $C_{ap}^{ads}(t_i)$ se reprezintă grafic funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul de sorbție. Exemple cu aceste reprezentări grafice se prezintă în figurile 1 și respectiv 2.

(1) Ecuția se poate atât în metoda directă. Toate celelalte ecuații se pot aplica doar în metoda indirectă.

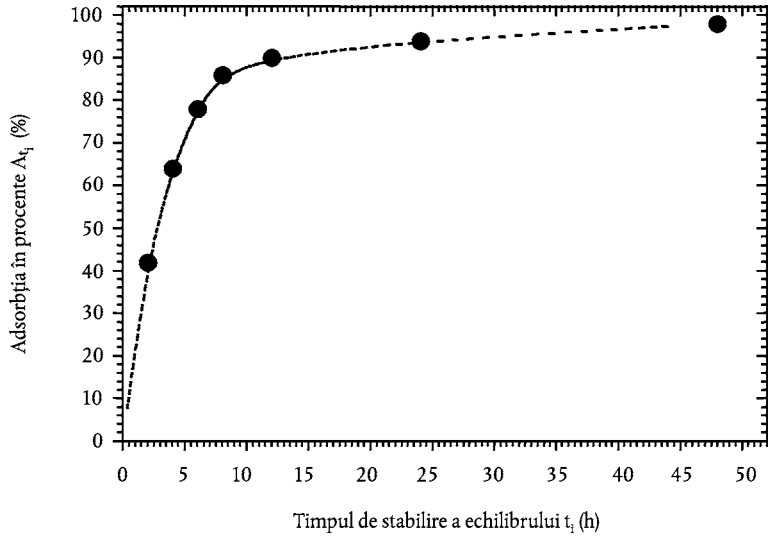


Fig. 1. Reprezentarea grafică a echilibrului de adsorbție

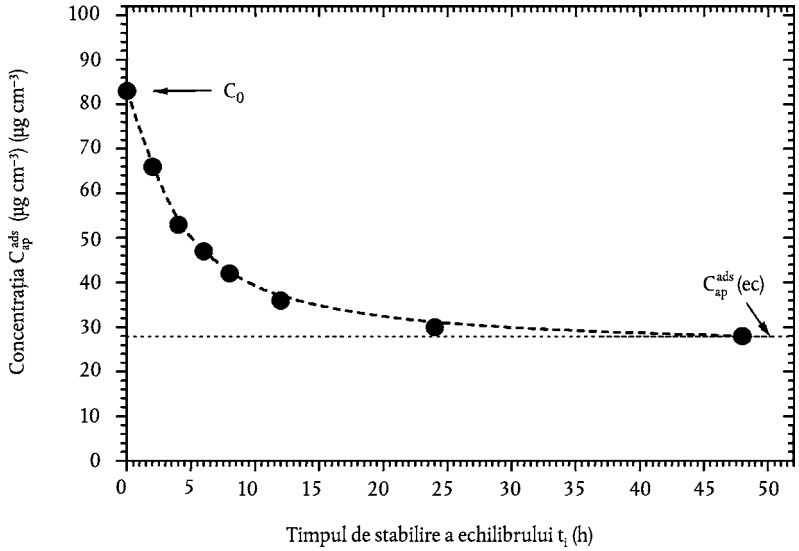


Fig. 2. Concentrația masică a substanței încercate în fază apoasă (C_{ap}) funcție de timp

(b) *Metoda în serie*

Ecuațiile prezentate în continuare țin seama de faptul că determinarea adsorbției se realizează prin măsurători ale substanței încercate în mici alicoți de fază apoasă la anumite intervale de timp.

— În fiecare interval de timp, se calculează cantitatea de substanță adsorbită pe sol, după cum urmează:

— pentru primul interval de timp $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— pentru al doilea interval de timp $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— pentru al treilea interval de timp $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— pentru al n-lea interval de timp $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Adsorbția, în procente, la fiecare interval de timp, $A_{\Delta t_i}$, se calculează cu ecuația următoare:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

în timp ce adsorbția, în procente, (A_{t_i}) la momentul t_i se obține cu ecuația:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Valorile adsorbției A_{t_i} sau $A_{\Delta t_i}$ (în funcție de necesitățile studiului) se reprezintă grafic funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul sorbției.

— La momentul echilibrului t_{ec}:

— masa substanței încercate adsorbite pe sol este:

$$m_s^{ads}(ec) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

— masa substanței încercate în soluție este:

$$m_{ap}^{ads}(ec) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— și adsorbția, în procente, la echilibru este:

$$A_{ec} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Parametrii din ecuațiile anterioare se definesc după cum urmează:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, …, $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa substanței adsorbite pe sol în intervalele de timp Δt_1, Δt_2, … și respectiv Δt_n (μg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, …, $m_n^{ads}(t_n)$ = masa substanței, măsurată într-un alicot v_a^A în momentele t_1, t_2, …, respectiv t_n (μg)

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg)

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

v_a^A = volumul alicotului în care se măsoară substanța testată (cm^3)

$A_{\Delta t_i}$ = adsorbția, în procente, ce corespunde la un interval de timp Δt_i (%)

A_{ec} = adsorbția, în procente, la echilibrul de adsorbție (%)

DESORBȚIA D (%)

Timpul t_0, la care începe proba pentru cinetica de desorbție, se consideră ca momentul în care volumul maxim recuperat de soluție a substanței încercate (după atingerea echilibrului de adsorbție) este înlocuit de un volum egal de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M.

(a) *Metoda paralelă*

La momentul t_i, se măsoară masa substanței încercate în faza apoasă luată din eprubeta i $\left(V_r^i\right)$ și masa desorbită se calculează conform ecuației:

$$m_{ap}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{ap}^{A} \quad (13)$$

La echilibrul de desorbție $t_i = t_{ec}$ și prin urmare $m_{ap}^{ads}(t_i) = m_{ap}^{ads}(ec)$.

Masa substanței încercate desorbite într-un interval (Δt_i) este dată de ecuația:

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_i) = m_{ap}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{ap}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorbția, în procente, se calculează:

— la momentul t_i din ecuația:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

— și în intervalul de timp (Δt_i) din ecuația:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

unde:

D_{t_i} = desorbția, în procente, la momentul t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = desorbția, în procente, care corespunde unui interval t_i (%)

$m_{ap}^{des}(t_i)$ = masa substanței încercate desorbite la momentul t_i, (μg)

$m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$ = masa substanței încercate desorbite în intervalul de timp t_i (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masa substanței încercate măsurate analitic la timpul t_i într-un volum de soluție V_r^i, care se ia pentru analiză (μg)

m_{ap}^{A} = masa substanței încercate rămase de la echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$$m_{ap}^{A} = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței încercate în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

V_R = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit de același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

V_r^i = volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru măsurarea substanței încercate, în proba pentru cinetica desorbției (cm^3)

Valorile desorbției D_{t_i} sau $D_{\Delta t_i}$ (în funcție de necesitățile studiului) sunt reprezentate grafic funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul de desorbție.

(b) *Metoda în serie*

Ecuațiile prezentate în continuare țin seama de faptul că determinarea adsorbției, care a avut loc anterior, s-a realizat prin măsurarea substanței încercate în alicoți mici $\left(v_a^A\right)$ de fază apoasă (metoda în serie de la 1.9 Realizarea încercării). Se consideră că: (a) volumul de supernatant scos din eprubetă după proba pentru determinarea cineticii de adsorbție a fost înlocuit cu același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (V_R) și (b) volumul total al fazei apoase în contact cu solul (V_T) în timpul probei pentru determinarea cineticii de desorbție rămâne constant și este dat de ecuația:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

La momentul t_i:

— masa substanței încercate se măsoară într-un alicot mic $\left(v_a^D\right)$ și se calculează masa desorbită, conform ecuației:

$$m_{ap}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— la echilibrul de desorbție $t_i = t_{ec}$ și prin urmare $m_{ap}^{des}(t_i) = m_{ap}^{des}(ec)$.

— desorbția, în procente, D_{t_i} se calculează din ecuația următoare:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (20)$$

La un interval de timp (Δt_i):

În fiecare interval de timp, se calculează cantitatea de substanță desorbită după cum urmează:

— pentru primul interval de timp $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^A \text{ și } m_s^{des}(t_1) = m_s^{ap}(ec) - m_{ap}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pentru al doilea interval de timp $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{ap}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (22) \text{ și}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(ec) - \left[m_{ap}^{des}(\Delta t_1) + m_{ap}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— pentru al n-lea interval de timp $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{ap}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23) \text{ și}$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(ec) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$$

În sfârșit, desorbția, în procente, la fiecare interval de timp, $D_{\Delta t_i}$, se calculează cu următoarea ecuație:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

în timp ce desorbția, în procente, D_{t_i} la momentul t_i este dată de ecuația:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{ap}^{des}(j)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100 = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

unde parametrii utilizați anterior se definesc după cum urmează:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$, …, $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masa substanței adsorbite în continuare pe sol după intervalele de timp Δt_1, Δt_2, …, respectiv Δt_n (μg)

$m_{ap}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{ap}^{des}(\Delta t_2)$, …, $m_{ap}^{des}(\Delta t_n)$ = masa substanței desorbite în intervalele de timp Δt_1, Δt_2, …, respectiv Δt_n (μg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$, …, $m_m^{des}(t_n)$ = masa substanței măsurată într-un alicot v_a^D la momentele t_1, t_2, …, respectiv t_n (μg)

V_T = volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul probei de cinetică a desorbției efectuate prin metoda în serie (cm^3)

m_{ap}^A = masa substanței încercate rămase de la echilibrul de desorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$$m_{ap}^A = \left(\frac{\left\langle V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right\rangle - V_R}{\left\langle V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right\rangle} \right) \cdot m_{ap}^{ads}(ec) \quad (26)$$

V_R = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

v_a^D = volumul alicotului luat pentru analiză din eprubeta (i) în timpul probei pentru cinetica desorbției realizate prin metoda în serie (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \quad (27)$$

APENDICELE 6

ADSORBȚIA - DESORBȚIA ÎN SOL: FORMULARE PENTRU RAPORTAREA DATELOR

Substanța testată:

Solul încercat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Parametrii determinați prin metoda de analiză

Solul cântărit	g	
Sol: substanța uscată	g	
Volumul soluție de $CaCl_2$	cm^3	
Concentrația nominală a soluției finale	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentrația analitică a soluției finale	$\mu g\ cm^{-3}$	

Principiul metodei analitice utilizate:

Etalonarea metodei analitice:

Substanța testată:

Solul încercat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitică urmată: Indirectă ☐ Paralelă ☐ În serie ☐

Directă ☐

Testarea de adsorbție: eșantioanele

	Simbol	Unități	Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului	
Nr. de eprubete										
Solul cântărit	—	g								
Solul: substanța uscată	m_{sol}	g								
Volumul apei din solul cântărit (calculat)	V_{AS}	cm^3								
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru		cm^3								
Volumul soluției mamă		cm^3								
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul	V_0	cm^3								
Concentrația inițială a soluției experimentale	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masa substanței încercate la începutul încercării	m_0	µg								
După agitare și centrifugare										
Metoda indirectă										
Metoda paralelă										
Concentrația substanței încercate în fază apoasă, inclusiv corecția probei martor	$C_{ap}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Metoda în serie										
Masa măsurată a substanței încercate în alicot V_a^A	$m_{ap}^{ads}(t_i)$	µg								
Metoda directă										
Masa substanței încercate adsorbite pe sol	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Calculul adsorbției										
Adsorbția	A_{ti}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Mijloacele										
Coeficientul de adsorbție	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Mijloacele										
Coeficientul de adsorbție	K_{co}	$cm^3\ g^{-1}$								
Mijloacele										

Substanța testată:

Solul încercat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: .....°C

Testarea de adsorbție: probe oarbe și martor

	Simbol	Unități	Proba oarbă		Proba oarbă		Proba martor	
Nr. de eprubete								
Solurile cântărite		g					0	0
Volumul apei din solul cântărit (calculat)		cm^3					—	—
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M adăugate		cm^3						
Volumul soluției mamă de substanță testată adăugată		cm^3	0	0				
Volumul total al fazei apoase (calculat)		cm^3					—	—
Concentrația inițială a substanței încercate în fază apoasă		$\mu g\ cm^{-3}$						
După agitare și centrifugare								
Concentrația în fază apoasă		$\mu g\ cm^{-3}$						

Observație: Dacă este necesar, se adaugă coloane.

Substanța testată:

Solul încercat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Bilanțul de masă

	Simbol	Unități				
Nr. de eprubete						
Solul cântărit	—	g				
Solul: substanța uscată	m_{sol}	g				
Volumul apei în solul cântărit (calculat)	V_{AS}	ml				
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru		ml				
Volumul soluției mamă		cm^3				
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul	V_0	cm^3				
Concentrația inițială a soluției experimentale	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$				
Timpul de realizare a echilibrului	—	h				
După agitare și centrifugare						
Concentrația substanței încercate în faza apoasă la adsorbție, inclusiv corecția probei oarbe la echilibru	C_{ap}^{ads} (ec)	$\mu g\ cm^{-3}$				
Timpul de realizare a echilibrului	t_{ec}	h				
Prima diluție cu solvent						
Volumul fazei apoase îndepărtate	V_{rec}	cm^3				
Volumul de solvent adăugat	ΔV	cm^3				
Prima extracție cu solvent						
Semnalul analizat în solvent	S_{EI}	var.				
Concentrația substanței încercate în solvent	C_{EI}	$\mu g\ cm^{-3}$				
Masa substanței extrase din sol și de pe pereții vaselor	m_{EI}	µg				
A doua diluție cu solvent						
Volumul de solvent îndepărtat	ΔV_s	cm^3				
Volumul de solvent adăugat	$\Delta V'$	cm^3				
A doua extracție cu solvent						
Semnalul analizat în solvent	S_{E2}	var.				
Concentrația substanței încercate în solvent	C_{E2}	$\mu g\ cm^{-3}$				
Masa substanței extrase din sol și de pe pereții vaselor	m_{E2}	µg				
Masa totală a substanței încercate extrase în două etape	m_E	µg				
Bilanțul de masă	BM	%				

Substanța testată:

Solul încercat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... **°C**

Izotermele de adsorbție

	Simbol	Unități								
Nr. de eprubete										
Solul cântărit	—	g								
Solul: substanța uscată	E	g								
Volumul apei în solul cântărit (calculat)	V_{AS}	cm^3								
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru		cm^3								
Volumul soluției mamă adăugat		cm^3								
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul (calculat)	V_0	cm^3								
Concentrația soluției	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Timpul de realizare a echilibrului	—	h								
După agitare și centrifugare										
Concentrația substanței în faza apoasă, inclusiv corecția probei oarbe	C_s^{ads} (ec)	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatura		°C								
Temperatura	C_s^{ads} (ec)	$\mu g\ g^{-1}$								

Analiza de regresie:

valoarea: K_F^{ads}

valoarea 1/n:

coeficientul de regresie r^2:

Substanța testată:

Solul încercat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitică urmată: Indirectă ☐ Paralelă ☐ În serie ☐

Testarea de desorbție

		Simbol	Unități	Interval de timp	Interval de timp	Interval de timp	Interval de timp
Nr. de eprubete ce vin de la etapa de adsorbție							
Masa substanței adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție		m_s^{des} (ec)	µg				
Volumul fazei apoase îndepărtate, înlocuit cu soluție de $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul	MP	V_0	cm^3				
	MS	V_T	cm^3				
Masa substanței încercate rămase după echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului		m_{ap}^{A}	µg				
Cinetica desorbției							
Masa măsurată a substanței desorbite din sol la momentul t_i.		m_m^{des} (t_i)	µg				
Volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru măsurarea substanței încercate	MP	V_r^i	cm^3				
	MS	V_a^D	cm^3				
Masa substanței desorbite din sol la momentul t_i (calculată)		m_{ap}^{des} (t_i)	µg				
Masa substanței desorbite din sol în intervalul de timp Δt_i (calculată)		m_{ap}^{des} (Δt_i)	µg				
Desorbția în procente							
Desorbția la momentul t_i.		D_{t_i}	%				
Desorbția în intervalul de timp Δt_i.		$D_{\Delta t_i}$	%				
Coeficientul de desorbție aparent		K_{des}					

MP: Metoda paralelă

MS: Metoda în serie

C.19. ESTIMAREA COEFICIENTULUI DE ADSORBȚIE (K_{CO}) PE SOL ȘI NĂMOL DE EPURARE CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (CLIP)

1. METODA

Prezenta metodă este identică cu cea prevăzută la orientările pentru încercări și analize ale OCDE 21(2000).

1.1. INTRODUCERE

Comportarea la sorbție a substanțelor din soluri și nămolurile de epurare se poate descrie cu ajutorul parametrilor determinați experimental prin metoda de testare C.18. Un parametru important este coeficientul de adsorbție care reprezintă raportul dintre concentrația substanței din sol/nămol și concentrația substanței în fază apoasă la echilibrul de adsorbție. Coeficientul de adsorbție normalizat la conținutul de carbon organic al solului K_{co} este un indicator util al capacității de fixare a unei substanțe chimice pe o substanță organică din sol și din nămolul de epurare și permite compararea diferitelor substanțe chimice. Parametrul menționat se poate estima prin corelări cu solubilitatea apei și coeficientul de partiție n-octanol/apă (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Metoda experimentală descrisă în prezenta testare utilizează CLIP pentru estimarea coeficientului de adsorbție K_{co} în sol și în nămolul de epurare (8). Estimările prezintă o credibilitate mai mare decât cele din calculele de relație cantitativă structură-activitate [RCSA (QSAR)] (9). Ca metodă de estimare, aceasta nu poate înlocui în întregime încercările de realizare a echilibrului probelor utilizate în metoda de testare C.18. Cu toate acestea, K_{co} estimat poate fi util în alegerea parametrilor optimi de testare pentru studiile de adsorbție/desorbție conform metodei de testare C.18, prin calcularea K_d (coeficientul de distribuție) sau K_f (coeficientul de adsorbție Freundlich) conform ecuației 3 (punctul 1.2).

1.2. DEFINIȚII

K_d: Coeficientul de distribuție este raportul dintre concentrațiile la echilibru, C, ale unei substanțe încercate dizolvate într-un sistem bifazic ce conține un adsorbant (sol sau nămol de epurare) și o fază apoasă; este o valoare adimensională atunci când concentrațiile în ambele faze se exprimă în greutate/greutate. Pentru concentrația în faza apoasă exprimată în greutate/volum, unitățile sunt $ml \cdot g^{-1}$. K_d poate să varieze în funcție de proprietățile adsorbantului și poate să fie dependent de concentrație.

$$K_d = \frac{C_{sol}}{C_{ap}} \text{ sau } \frac{C_{nămol}}{C_{ap}} \quad (1)$$

unde:

C_{sol} = concentrația substanței încercate în sol la echilibru ($\mu g \cdot g^{-1}$)

$C_{nămol}$ = concentrația substanței încercate în nămol la echilibru ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{ap} = concentrația substanței încercate în faza apoasă la echilibru ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

K_f: Coeficientul de adsorbție Freundlich este concentrația substanței încercate în sol sau nămolul de epurare (x/m) atunci când concentrația la echilibru, C_{ap}, în faza apoasă este egală cu unu; unitățile sunt $\mu g\ g^{-1}$ adsorbant. Valoarea poate să varieze în funcție de proprietățile adsorbantului.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{ap} \quad (2)$$

unde:

x/m = cantitatea de substanță testată x (μg) adsorbiă pe cantitatea de adsorbant m (g) la echilibru

1/n = panta izotermei de adsorbție Freundlich

C_{ap} = concentrația substanței încercate în fază apoasă la echilibru ($\mu g \cdot ml^{-1}$).

Pentru $C_{ap} = 1$; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{co}: Coeficientul de distribuție (K_d) sau coeficientul de adsorbție Freundlich (K_f) normalizat la conținutul de carbon organic (f_{co}) al adsorbantului; în special pentru substanțele chimice neionizate, este un indicator aproximativ al gradului de adsorbție între o substanță și adsorbant și permite compararea diferitelor substanțe chimice. În funcție de dimensiunile Kd și K_f, K_{co} poate să fie adimensional sau să aibă unitățile ml g^{-1} sau µg g^{-1} substanță organică.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left(\text{adimensional sau ml} \cdot g^{-1}\right) \text{ sau } \frac{K_f}{f_{oc}} \left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Relația dintre K_{co} și K_d nu este lineară întotdeauna și, prin urmare, valorile K_{co} pot să varieze de la un sol la altul, dar gradul de variație a acestora este redus în mare măsură în comparație cu valorile K_d sau K_f.

Coeficientul de adsorbție (K_{co}) se obține din factorul de capacitate (k′), utilizând o curbă de etalonare obținută prin reprezentarea grafică a log k′ funcție de log K_{co} pentru compușii de referință selectați.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

unde:

t_g: timpul de retenție CLIP pentru testare și substanța de referință (minute)

t_0: timpul mort (minute) (punctul 1.8.2).

P_{oa}: Coeficientul de partiție octanol-apă reprezintă raportul dintre concentrațiile substanței dizolvate în n-octanol și apă; este o mărime adimensională.

$$P_{oa} = \frac{C_{octanol}}{C_{ap}} \left(= K_{oa}\right) \quad (5)$$

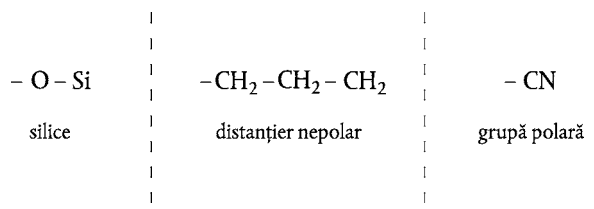
1.3. SUBSTANȚELE DE REFERINȚĂ

Înaintea utilizării metodei, este necesar să se cunoască formula structurală, puritatea și constanta de disociere (dacă este cazul). Sunt utile datele privind solubilitatea în apă și solvenți organici, coeficientul de partiție octanol-apă și caracteristicile hidrolizei.

Pentru a corela datele de retenție CLIP măsurate pentru o substanță testată cu coeficientul de adsorbție al acesteia K_{co}, trebuie să se reprezinte grafic curba de etalonare pentru log K_{co} funcție de log k′. Trebuie să se utilizeze cel puțin șase puncte, cel puți unul peste și unul sub valoarea preconizată pentru substanța testată. Acuratețea metodei este mult îmbunătățită, dacă se utilizează substanțe de referință cu structura asemănătoare cu a substanței încercate. Dacă astfel de date nu sunt disponibile, este la latitudinea utilizatorului să aleagă substanțele de etalonare potrivite. În acest caz, este necesar să se aleagă un set mai general de substanțe eterogene din punct de vedere structural. Substanțele și valorile K_{co} care se pot utiliza sunt prezentate în apendice, în tabelul 1 pentru nămolul de epurare și în tabelul 3 pentru sol. Alegerea altor substanțe de etalonare se justifică.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

CLIP se realizează pe o coloană analitică umplută cu o fază solidă de cianopropil care se comercializează și care conține grupe liofile și polare. Se utilizează o fază staționară polară din matrice de silice.



Principiul metodei de testare este similar cu cel al metodei de testare A.8 (coeficientul de partiție, metoda CLIP). Când trece prin coloană în lungul fazei mobile, substanța testată interacționează cu faza staționară. Ca urmare a partiției dintre faza mobilă și cea staționară, substanța testată este întârziată. Compoziția dublă a fazei staționare, care are porțiuni polare și nepolare, permite interacțiunea grupelor polare și nepolare dintr-o moleculă într-un mod similar cu cel pentru substanța organică din matricele de sol sau nămol de epurare. Aceasta permite stabilirea relației dintre timpul de retenție pe coloană și coeficientul de adsorbție pe substanța organică.

pH-ul are o influență importantă în mod deosebit asupra comportamentului de sorbție al substanțelor polare. Pentru solurile agricole sau rezervoarele stațiilor de tratare a apelor reziduale, pH-ul variază de obicei între 5,5 și 7,5. Pentru substanțele ionizabile, trebuie să se efectueze două testări, atât cu forma ionizată cât și cu cea neionizată în soluții tampon corespunzătoare, dar numai pentru situațiile în care cel puțin 10 % din compusul testat se disociază între valorile pH-ului 5,5-7,5.

Deoarece pentru evaluare se utilizează doar relația dintre retenția pe coloana CLIP și coeficientul de adsorbție, nu este necesară o metodă analitică cantitativă, ci doar determinarea timpului de retenție. Dacă este disponibil un set corespunzător de substanțe de referință și se pot utiliza condițiile experimentale standard, metoda oferă un mod rapid și eficient pentru estimarea coeficientului de adsorbție K_{co}.

1.5. APLICABILITATEA TESTULUI

Metoda CLIP se poate aplica substanțelor chimice (nemarcate și marcate) pentru care există un sistem corespunzător de detecție (de exemplu spectrofotometru, detector de radioactivitate) și care sunt suficient de stabile în timpul testării. Această metodă poate să fie deosebit de utilă pentru substanțele chimice dificil de studiat în alte sisteme experimentale (adică substanțele volatile; substanțe care nu sunt solubile în apă la o concentrație care să poată fi măsurată analitic; substanțe cu afinitate mare pentru suprafața sistemelor de incubare). Metoda se poate utiliza la amestecurile care dau benzi de eluție neseparate. În acest caz, este necesar să se stabilească limitele superioară și inferioară ale valorilor log K_{co} pentru compușii amestecului testat.

Impuritățile pot să creeze uneori probleme în interpretarea rezultatelor CLIP, dar sunt de importanță minoră atâta timp cât substanța testată se poate identifica și separa analitic în mod clar de impurități.

Metoda este validată pentru substanțele prezentate în tabelul 1 din apendice și a fost de asemenea aplicată pentru o serie de alte substanțe din următoarele clase de substanțe chimice:

— amine aromate (de exemplu, trifluralin, 4-cloroanilină, 3,5-dinitroanilină, 4-metlanilină, N-metilanilină, 1-naftilamină), esterul etilic al acidului 3,5-dinitrobenzoic;

— esteri ai acizilor carboxilici aromați (de exemplu, esterul metilic al acidului benzoic, esterul etilic al acidului 3,5-dinitrobenzoic);

— hidrocarburi aromate (de exemplu, toluen, xilen, etilbenzen, nitrobenzen);

— esteri ai acizilor ariloxifenoxipropionici (de exemplu, metil-diclofop, etil-fenoxaprop, p-etil-fenoxaprop);

— fungicide pe bază de benzimidazol sau imidazol (de exemplu, carbendazim, fuberidazol, triazoxid);

— amide ale acizilor carboxilici (de exemplu, 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida);

— hidrocarburi clorurate (de exemplu, endosulfan, DDT, hexaclorobenzen, quintozen, 1,2,3-triclorobenzen);

— insecticide organofosforoase (de exemplu, metil-azinfor, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);

— fenoli (de exemplu, fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol);

— derivați de fenilurее (de exemplu, izoproturon, monolinuron, pencycuron);

— pigmenți coloranți (de exemplu, Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

— hidrocarburi poliaromate (de exemplu, acenaften, naftalen);

— ierbicide pe bază de 1,3,5-triazine (de exemplu, prometrin, propazină, simazină, terbutrin);

— derivați de triazol (de exemplu, tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Prezenta metodă nu se poate aplica la substanțele care reacționează fie cu eluentul, fie cu faza staționară. De asemenea, nu se aplică la substanțele care interacționează în mod specific cu componentele anorganice (de exemplu, formarea de complecși ramificați cu mineralele din argilă). Este posibil ca metoda să nu funcționeze la substanțele tensioactive, compușii anorganici și acizii și bazele organici(e) moderați(e) sau puternici(e). Se pot determina valorile log K_{co} cuprinse între 1,5 și 5,0. Determinarea substanțelor ionizabile trebuie să se realizeze cu o fază mobilă tamponată, dar trebuie să se aibă grijă pentru a evita precipitarea componentelor tamponului sau a substanței testate.

1.6. CRITERIILE DE CALITATE

1.6.1. **Acuratețea**

De obicei, coeficientul de adsorbție al unei substanțe testate se poate estima cu o aproximație de ± 0,5 dintr-o unitate logaritmică din valoarea determinată prin metoda de stabilire a echilibrului probelor (tabelul 1 din apendice). Dacă substanțele de referință utilizate au structuri asemănătoare cu cea a substanței testate, se poate obține o acuratețe mai mare.

1.6.2. **Repetabilitatea**

Determinările trebuie să se facă cel puțin în dublu exemplar. Valorile log K_{co} obținute din măsurătorile individuale trebuie să se situeze într-un interval de 0,25 dintr-o unitate logaritmică.

1.6.3. **Reproductibilitatea**

Experiența acumulată până în prezent în aplicarea metodei susține valabilitatea acesteia. Un studiu prin metoda CLIP, în care s-au utilizat 48 substanțe (majoritatea pesticide) pentru care existau date credibile privind K_{co} pentru soluri, a dat un coeficient de corelare R = 0,95 (10) (11).

S-a realizat un studiu comparativ între laboratoare, cu participarea a 11 laboratoare, pentru îmbunătățirea și validarea metodei (12). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2 din apendice.

1.7. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.7.1. **Estimarea preliminară a coeficientului de adsorbție**

Coeficientul de partiție octanol-apă P_{oa} (= K_{oa}) și, într-o anumită măsură, solubilitatea în apă se pot utiliza ca indicatori pentru gradul de adsorbție, în special pentru substanțele neionizate și, prin urmare, se pot utiliza pentru aflarea preliminară a domeniului. Au fost publicate o serie de corelații utile pentru câteva grupe de substanțe chimice (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Aparatura**

Este necesar un cromatograf lichid prevăzut cu o pompă fără impulsuri și cu un dispozitiv potrivit de detecție. Se recomandă utilizarea unui injector cu buclă de injecție. Se utilizează rășini pe bază de cianopropil fixat chimic pe suport de silice (de exemplu Hypersil și Zorax CN). O coloană de protecție din același material se poate instala între sistemul de injecție și coloana analitică. Coloanele provenite de la diverși furnizori pot să aibă randamente de separare foarte diferite. Pentru orientare, este necesar să se obțină următorii factori de capacitate k′: log k′ > 0,0 pentru log K_{co} = 3,0 și log k′ > 0,4 pentru log K_{co} = 2,0 atunci când se utilizează amestec metanol/apă 55/45 % ca fază mobilă.

1.7.3. **Fazele mobile**

Au fost testate câteva faze mobile și se recomandă următoarele două:

— metanol/apă (55/45 % volum/volum);

— metanol/tampon citrat 0,01 M, pH 6,0 (55/45 % volum/volum).

Se utilizează metanolul de tip CLIP și apă distilată sau tampon citrat pentru prepararea solventului de eluție. Amestecul se dezaerează înainte de utilizare. Se utilizează eluția izocratică. Dacă amestecurile metanol/apă nu sunt corespunzătoare, se pot încerca alte amestecuri solvent organic/apă, de exemplu, amestecurile etanol/apă sau acrilonitril/apă. Pentru compușii ionizabili se recomandă utilizarea soluției tampon pentru stabilizarea pH-ului. Trebuie să se aibă grijă pentru a evita precipitarea sărurilor și deteriorarea coloanei, care pot să apară la unele amestecuri fază organică/tampon.

Nu se pot utiliza aditivi cum ar fi reactivi cu perechi de ioni, deoarece pot să afecteze proprietățile de sorbție ale fazei staționare. Astfel de modificări ale fazei staționare pot să fie ireversibile. Din acest motiv, este obligatoriu ca testele cu aditivi să se efectueze pe coloane separate.

1.7.4. **Substanța dizolvată**

Substanțele testate și de referință se dizolvă în faza mobilă.

1.8. REALIZAREA TESTĂRII

1.8.1. **Condiții experimentale**

Este necesară înregistrarea temperaturii în timpul măsurătorilor. Pentru asigurarea condițiilor constante în timpul etalonării și estimării și măsurării substanței testate, se recomandă cu stringență utilizarea unui compartiment termoreglabil pentru coloană.

1.8.2. **Determinarea timpului mort t_0**

Pentru determinarea timpului mort t_0, se pot utiliza două metode diferite (vezi și punctul 1.2).

1.8.2.1. *Determinarea timpului mort t_0 cu ajutorul seriilor omoloage*

S-a dovedit că procedeul de acest tip dă valori t_0 credibile și standardizate. Pentru detalii, a se vedea metoda de testare A.8: coeficientul de partiție (n-octanol/apă), metoda CLIP.

1.8.2.2. *Determinarea timpului mort t_0 cu substanțe inerte care nu sunt reținute pe coloană*

Procedeul menționat se bazează pe injecția soluțiilor de formamidă, uree sau nitrat de sodiu. Măsurătorile se realizează cel puțin de două ori.

1.8.3. **Determinarea timpilor de retenție t_R**

Se procedează la selectarea substanțelor de referință conform punctului 1.3. Acestea se pot injecta ca amestec etalon pentru determinarea timpilor lor de retenție, cu condiția confirmării că timpul de retenție pentru fiecare etalon nu este afectat de prezența altor etaloane de referință. Etalonarea se face la intervale regulate, cel puțin de două ori pe zi, datorită modificărilor neașteptate în funcționarea coloanei. Pentru cea mai bună practică, injecțiile de etalonare se realizează înainte și după injecțiile de substanță testată pentru a confirma că timpii de retenție nu au fost deplasați. Substanțele încercate se injectează separat în cantități cât se poate de mici (pentru a evita supraîncărcarea coloanei) și se determină timpii de retenție pentru acestea.

Pentru a crește încrederea în măsurători, trebuie să se realizeze cel puțin două determinări. Valorile log K_{co} obținute din măsurători individuale trebuie să se încadreze într-o valoare de 0,25 dintr-o unitate logaritmică.

1.8.4. **Evaluarea**

Se calculează factorii de capacitate k′ din timpul mort t_0 și timpii de retenție t_R pentru substanțele de referință selectate conform ecuației 4 (punctul 1.2). Apoi, se reprezintă grafic valorile log k′ ale substanțelor de referință funcție de valorile log K_{co} ale acestora, obținute din testele cu realizarea echilibrului probelor, prezentate în tabelele 1 și 3 din apendice. Din reprezentarea grafică menționată, valoarea log k′ a unei substanțe testate se utilizează apoi pentru determinarea valorii log K_{co} a acesteia. Dacă rezultatele reale indică o valoare a log K_{co} pentru substanța testată în afara domeniului de etalonat, testarea se repetă, utilizând alte substanțe de referință mai potrivite.

2. **REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA**

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

— identitatea testului și substanțelor de referință și puritatea acestora și valorile pK_a, dacă sunt importante;

— descrierea aparaturii și a condițiilor de operare, de exemplu tipul și dimensiunea coloanei analitice (și a celei de protecție), mijloacele de detecție, faza mobilă (raportul componentelor și valoarea pH), valorile temperaturii în timpul măsurătorilor;

— timpul mort și metoda utilizată pentru determinarea acestuia;

— cantitățile de substanțe testate și de referință introduse în coloană;

— timpii de retenție pentru compușii de referință utilizați la etalonare;

— detalii privind linia de regresie ajustată (log k′ funcție de log K_{co}) și un grafic al liniei de regresie;

— datele medii de retenție și valoarea estimată a log K_{co} pentru compusul testat;

— cromatogramele.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(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, 1 67.

(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.

(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. 833-846.

(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, J. 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.

APENDICE

TABELUL 1

Compararea valorilor K_{co} pentru soluri și nămoluri de epurare și valorile calculate cu ajutorul metodei selective CLIP [1] [2]

Substanța	Nr. CAS	Log K_{co} nămoluri de epurare	Log K_{co} CLIP	Δ	Log K_{co} soluri	Log K_{co} CLIP	Δ
Atrazină	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Esterul fenilic al acidului benzoic	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamidă	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamidă	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilidă	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilină	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dicloroanilină	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.

TABELUL 2

Rezultatele studiului comparativ între laboratoare (11 laboratoare participante) efectuat pentru îmbunătățirea și validarea metodei CLIP [1]

Substanța	Nr. CAS	Log K_{co} (OCDE 106)	K_{co}	log K_{co}
			metoda CLIP	
Atrazină	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.

TABELUL 3

Substanțele de referință recomandate pentru metoda selectivă CLIP pe baza datelor de adsorbție pe sol

Substanța de referință	Nr. CAS	Valorile medii ale log K_{co} din echilibrul probelor	Nr. de date K_{co}	Log D. S.	Sursa
Acetanilidă	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamidă	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N,N-dimetilbenzamidă	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Metilmenzamidă	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metilbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazină	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Izoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobenzamidă	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilină	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamidă	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Triclorobenzen	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-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Metil-diclofop	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (amestec)	26850-47-5	4,89	4	4,46	[a]
	12270-13-2				
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 01 044 (1994)

[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.

[c] Date din industrie.

C.20. TEST DE REPRODUCERE PENTRU *DAPHNIA MAGNA*

1. METODA

Prezenta metodă de testare a toxicității pentru reproducere reproduce Orientarea 211 a OCDE (1998).

1.1. INTRODUCERE

Obiectivul principal al testului este evaluarea efectului produselor chimice asupra randamentului de reproducere al *Daphnia magna*.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Animale părinți: sunt acele femele de dafnia prezente la începutul testului și al căror randament de reproducere constituie obiectul studiului.

Progenitură: exemplarele tinere de dafnia produse de animalele părinți în cursul testului.

Concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO): este concentrația cea mai mică experimentată la care se observă un efect important al substanței din punct de vedere statistic asupra reproducerii și mortalității părinților (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul, într-un timp de expunere stabilit. Cu toate acestea, toate concentrațiile experimentate mai mari decât CMEO trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la CMEO. Când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, trebuie să se prezinte o explicație completă a modului de alegere a CMEO (și, prin urmare, CFEO).

Concentrația la care nu se observă nici un efect (CFEO): este concentrația experimentată imediat sub CMEO, care, în comparație cu martorul, nu are un efect important din punct de vedere statistic ($p < 0,05$), într-un timp de expunere stabilit.

EC_x: este concentrația substanței testate dizolvate în apă care generează o reducere de x % a reproducerii la *Daphnia magna* într-un timp de expunere stabilit.

Rata intrinsecă de înmulțire: este o măsură a creșterii populației care cuprinde capacitatea de reproducere și mortalitatea specifică vârstei (20) (21) (22). La populațiile în stare stabilă, aceasta va fi egală cu zero. La populațiile în creștere, aceasta va fi pozitivă și la populațiile în scădere, va fi negativă. Este clar că aceasta din urmă nu este de susținut și în final va duce la dispariție.

Limita de detecție: este cea mai mică concentrație care se poate detecta dar nu se poate măsura.

Limita de determinare: este cea mai mică concentrație care se poate determina cantitativ.

Mortalitatea: un animal se înregistrează ca mort atunci când este imobil, adică atunci când nu poate să înoate sau dacă nu se observă o mișcare a organelor externe sau a postabdomenului, în 15 secunde de la o ușoară agitare a recipientului experimental. (Dacă se utilizează o altă definiție, aceasta se specifică împreună cu sursa bibliografică).

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Femelele tinere de dafnia (animale părinți), în vârstă de mai puțin de 24 ore la începutul testului, sunt expuse la substanța testată, adăugată într-o o serie de concentrații diferite. Durata testului este de 21 de zile. La sfârșitul testului, se evaluează numărul total de progenituri în viață produse per animal părinte viu la sfârșitul testului. Aceasta înseamnă că tineretul produs de adulții care mor în timpul testului este exclus din calcule. Capacitatea de reproducere a animalelor părinți se poate exprima în alte moduri (de exemplu, numărul de progenituri în viață produse per animal per zi, din prima zi în care s-au observat progeniturile), dar acestea se semnalează în afară de numărul total de tineret produs per părinte viu la sfârșitul testului. Capacitatea de reproducere a animalelor expuse la substanța testată se compară cu aceea a martorului(rilor) pentru a determina concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO) și, din aceasta, concentrația la care nu se observă nici un efect (CFEO). În afară de aceasta și în măsura în care este posibil, rezultatele sunt analizate cu ajutorul unui model de regresie pentru estimarea concentrației care ar putea să provoace o reducere cu x % a capacității de reproducere (adică EC_{50}, EC_{20} sau EC_{10}).

De asemenea, se semnalează supraviețuirea animalelor părinți și timpul producerii primilor pui. Se mai pot studia alte efecte aferente substanței asupra unor parametri cum ar fi creșterea (de exemplu, lungimea) și posibil rata intrinsecă de înmulțire.

1.4. DATE PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

Datele unui test de toxicitate acută (metoda C.2, partea I) efectuat cu *Daphnia magna* trebuie să fie disponibile. Rezultatul poate să fie util la selectarea unui domeniu potrivit de concentrații experimentale în testele de reproducere. Este necesar să se cunoască solubilitatea în apă și presiunea de vapori a substanței testate și să existe o metodă analitică fiabilă pentru determinarea cantitativă a substanței în soluțiile experimentale, cu eficiența recuperării și limita de detecție specificate.

Datele privind substanța testată, care pot să fie utile în stabilirea condițiilor de testare, includ formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului, pK_a, P_{oa} și rezultatele testului pentru biodegradabilitate imediată (a se vedea metoda C,4).

1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, martorul (martorii) trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

— mortalitatea animalelor părinți (femele de dafnia) să nu depășească 20 % la sfârșitul testului;

— numărul mediu de progenituri vii produse per animal părinte supraviețuitor la sfârșitul testului să fie ≥ 60.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Aparatura**

Vasele experimentale și altă aparatură care vine în contact cu soluțiile experimentale trebuie să fie realizate în întregime din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. De obicei, vasele experimentale sunt pahare de laborator.

În afară de acestea, mai sunt necesare următoarele aparate:

— contor de oxigen (cu microelectrod sau alt dispozitiv corespunzător pentru măsurarea oxigenului dizolvat în probe de volum mic);

— aparat specific pentru controlul temperaturii;

— pH-metru;

— aparat pentru determinarea durității apei;

— aparat pentru determinarea concentrației totale de carbon organic (COT) în apă sau aparat pentru determinarea consumului chimic de oxigen (CCO);

— aparat specific pentru controlul regimului de iluminare și măsurarea intensității luminii.

1.6.2. **Organismul experimental**

Specia utilizată în test este *Daphnia magna* Straus. Se pot utiliza și alte specii de dafnia, cu condiția ca acestea să îndeplinească criteriile de validitate după caz (criteriul de validitate referitor la cpacitatea de reproducere la martori trebuie să fie relevant pentru speciile dafnia). Dacă se utilizează alte specii de dafnia, acestea trebuie să se identifice în mod clar și să se justifice utilizarea lor.

De preferință, clonul trebuie să fi fost identificat după genotip. Studiul (1) a arătat că performanța de reproducere a clonului A (care provine din IRCHA din Franța) (3) satisface complet criteriile de validitate pentru o medie de ≥ 60 progenituri per animal părinte supraviețuitor atunci când se cultivă în condițiile descrise în prezenta metodă. Cu toate acestea, se acceptă și alți cloni, cu condiția să se indice îndeplinirea criteriilor de validitate pentru test de către cultura de dafnia.

La începutul testului, animalele trebuie să fie mai tinere de 24 ore și nu trebuie să fie prima generație. Acestea trebuie să provină dintr-o colonie sănătoasă (adică fără semne de stres, cum ar fi mortalitatea mare, prezența masculilor și ephippia, întârziere în producerea primilor descendenți, animale decolorate etc.). Animalele din colonie trebuie ținute în condiții de cultură (lumină, temperatură, mediu, hrană și număr de animale per unitatea de volum) similare cu cele utilizate în test. Dacă mediul de cultură ce urmează să fie utilizat în test este diferit de cel pentru cultura obișnuită de dafnia, este o bună practică să se includă o perioadă de aclimatizare înaintea testului, de obicei de aproximativ trei săptămâni (adică o generație), pentru a evita stresarea animalelor părinți.

1.6.3. **Mediul experimental**

În prezentul test, se recomandă utilizarea unui mediu bine definit. Acesta poate să evite utilizarea aditivilor (de exemplu, plante de mare, extract de sol etc.) a căror caracterizare este dificilă și, prin urmare, se îmbunătățesc posibilitățile de standardizare între laboratoare. S-a găsit că mediile Elendt M4 (4) și M7 (a se vedea apendicele 1) sunt potrivite în acest sens. Cu toate acestea, se pot accepta și alte medii [de exemplu, (5) (6)], cu condiția să asigure realizarea unei culturi de dafnia care să întrunească criteriile de validitate pentru test.

Dacă se utilizează medii ce conțin aditivi care nu sunt caracterizați, este necesar ca aditivii respectivi să se specifice clar și, în raportul testului, să se prezinte date privind compoziția, în special conținutul de carbon, deoarece acesta poate contribui la hrana furnizată. Se recomandă determinarea concentrației totale de carbonului organic (COT) și a consumul chimic de oxigen (CCO) la prepararea amestecului de aditivi organici și să se facă o estimare a contribuției rezultate la COT/CCO în mediul experimental. Se recomandă ca valorile COT în mediu (adică înainte de adăugarea algelor) să fie mai mici de 2 mg/l (7).

Când se testează substanțe cu conținut de metale, este important să se admită că proprietățile mediului experimental (de exemplu, duritatea, capacitatea de chelatizare) ar putea să aibă legătură cu toxicitatea substanței studiate. De aceea, este de preferat un mediu bine caracterizat. Cu toate acestea, în prezent, singurele medii bine caracterizate care se cunosc ca fiind optime pentru cultura pe termen lung a *Daphnia magna* sunt Elendt M4 și M7. Ambele medii conțin agentul de chelatizare EDTA. Cercetările (2) arată că „toxicitatea aparentă" a cadmiului este în general mai mică atunci când testul de reproducere se realizează în mediile M4 și M7 decât în mediile cu conținut de EDTA. Prin urmare, M4 și M7 nu se recomandă pentru substanțele de probă ce conțin metale și, de asemenea, trebuie să se evite alte medii ce conțin agenți de chelatizare cunoscuți. Pentru substanțele cu conținut de metale, se poate recomanda utilizarea unui mediu alternativ, de exemplu apa dură proaspătă reconstituită conform ASTM (7), care nu conține EDTA, cu adaos de extract de plante de mare (8). Combinația menționată, de apă dură proaspătă reconstituită conform ASTM și extract de plante de mare, este potrivită și pentru cultura pe termen lung și testarea *Daphnia magna* (2), deși aceasta mai exercită o acțiune slabă de chelatizare datorită componentei organice din extractul de plante de mare adăugat.

La începutul și în timpul testului, concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie mai mare de 3 mg/l. pH-ul trebuie să aibă valori în domeniul 6-9 și, în mod normal, nu trebuie să varieze cu mai mult de 1,5 unități în oricare din încercări. Se recomandă o duritate mai mare de 140 mg/l (exprimată în $CaCO_3$). Testele efectuate la această valoare și la valori mai mari au demonstrat o performanță a reproducerii conformă cu criteriile de validitate (9) (10).

1.6.4. **Soluțiile experimentale**

Soluțiile experimentale de concentrațiile alese se prepară de obicei prin diluarea unei soluții mamă. Soluțiile mamă se prepară de preferință prin dizolvarea substanței în mediul experimental.

În unele cazuri, s-ar putea să fie necesară utilizarea solvenților organici sau a agenților de dispersie pentru a obține o soluție mamă de concentrația indicată, dar trebuie făcut tot posibilul pentru a se evita utilizarea acestor materiale. Ca solvenți potriviți se pot utiliza acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilen glicolul. Exemple de agenți de dispersie potriviți sunt Cremophor RH40, metilceluloza 0,01 % și HCO-40. În orice caz, substanța testată în soluțiile experimentale nu trebuie să depășească limita de solubilitate în mediul experimental.

Se utilizează solvenți pentru a obține o soluție mamă care să se poată doza cu exactitate în apă. La concentrația recomandată a solventului în mediul experimental final (adică ≤ 0,1 ml/l), solvenții enumerați anterior nu sunt toxici și nu cresc solubilitatea în apă a unei substanțe.

Agenții de dispersie pot să faciliteze dozarea exactă și dispersia. La concentrația recomandată în mediul experimental final (≤ 0,1 ml/l), agenții de dispersie enumerați anterior nu sunt toxici și nu cresc solubilitatea în apă a unei substanțe.

1.7. PROTOCOLUL TESTULUI

Tratamentele se repartizează tuturor vaselor experimentale și toată manipularea ulterioară a vaselor experimentale se face în mod aleatoriu. Nerespectarea acestui principiu poate să aducă prejudicii care pot fi interpretate ca fiind un efect al concentrației. În special, dacă unitățile experimentale sunt manipulate în ordinea tratamentului sau a concentrației, atunci unele efecte care depind de timp, cum ar fi oboseala operatorului sau altă eroare, ar putea să genereze efecte mai mari la concentrații mai mari. În plus, dacă există posibilitatea ca rezultatele testului să fie influențate de o condiție inițială sau de mediu a testului, cum ar fi poziția în laborator, atunci trebuie să se aibă în vedere oprirea testului.

1.8. MODUL DE LUCRU

1.8.1. **Condiții de expunere**

1.8.1.1. *Durata*

Durata testului este de 21 de zile.

1.8.1.2. *Încărcarea*

Animalele părinți se țin individual, câte unul în fiecare vas experimental, care conține 50-100 ml mediu.

Uneori, s-ar putea să fie necesare volume mai mari pentru a satisface condițiile procedeului analitic utilizat pentru determinarea concentrației substanței testate, deși este permisă și unirea probelor duble pentru analiza chimică. Dacă se utilizează volume mai mari de 100 ml, s-ar putea ca rația furnizată pentru dafnia să fie crescută pentru a asigura o alimentație adecvată și respectarea criteriilor de validitate. Pentru testele în flux continuu, se pot avea în vedere, din motive tehnice, alte protocoale (de exemplu, patru grupe de 10 animale într-un volum de mediu experimental mai mare), dar se specifică orice modificări ale protocolului testului.

1.8.1.3. *Numărul animalelor*

Pentru testele semistatice, cel puțin 10 animale ținute fiecare la fiecare concentrație experimentată și cel puțin 10 animale ținute fiecare în seria martor.

Pentru testele în flux continuu, s-a dovedit că sunt necesare 40 de animale împărțite în patru grupe de câte 10 animale pentru fiecare concentrație experimentată (1). Se pot utiliza mai puține organisme experimentale și se recomandă un minimum de 20 de animale per concentrație, împărțite în două sau mai multe probe identice cu un număr egal de animale (de exemplu, patru probe identice, fiecare cu cinci daphnide). De reținut că pentru testele în care animalele sunt ținute în grupe, nu va fi posibilă exprimarea capacității de reproducere sub forma numărului total de progenituri vii produse per animal părinte în viață la sfârșitul testului, dacă animalele părinți mor. În aceste cazuri, capacitatea de reproducere se exprimă prin „numărul total de progenituri vii produse per părinte prezent la începutul testului".

1.8.1.4. *Administrarea hranei*

Pentru testele semistatice, hrana se administrează de preferință zilnic, dar cel puțin de trei ori pe săptămână (adică să corespundă modificărilor mediilor). Se consemnează orice abatere de la această regulă (de exemplu, pentru testele în flux continuu).

Pe durata testului, hrana animalelor părinți este alcătuită de preferință din celule de alge vii din una sau mai multe din următoarele specii: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* [acum *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] și *Scenedesmus subspicatus*. Regimul alimentar ia în considerație conținutul de carbon organic (C) administrat fiecărui animal părinte. Cercetările (12) au arătat că, pentru *Daphnia magna*, rațiile cuprinse între 0,1 și 0,2 mg C/dafnia/zi sunt suficiente pentru obținerea numărului necesar de progenituri care să satisfacă criteriile de validitate a testului. Rația se poate administra fie sub forma unei porții constante pe toată perioada testului sau, dacă se dorește, se administrează o porție mai mică la început și apoi se crește în timpul testului, ținând cont de creșterea animalelor părinți. În cazul menționat, rația tot trebuie să rămână între valorile recomandate de 0,1-0,2 mg C/dafnia/zi tot timpul.

Dacă urmează să se utilizeze măsuri înlocuitoare, de exemplu numărul de celule de alge sau absorbanța luminii, la administrarea rației (adică pentru ușurință, deoarece măsurarea conținutului de carbon durează mult), fiecare laborator trebuie să-și realizeze propria nomogramă referitoare la măsura înlocuitoare pentru conținutul de carbon al culturii de alge (a se vedea apendicele 2 pentru recomandarea privind realizarea nomogramei). Nomogramele se verifică cel puțin anual și mai frecvent, dacă au fost schimbate condițiile de cultură a algelor. S-a găsit că absorbanța luminii este un înlocuitor mai bun pentru conținutul de carbon decât numărul de celule (13).

Pentru a minimiza volumul mediului de cultură de alge transferat în vasele experimentale se administrează o suspensie de alge concentrată pentru dafnia. Concentrația de alge se poate obține prin centrifugare urmată de resuspensie în apă distilată, apă deionizată sau mediu de cultură pentru dafnia.

1.8.1.5. *Lumina*

16 ore de lumină la o intensitate de maximum 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatura*

Temperatura mediilor experimentale trebuie să fie cuprinsă între valorile 18-22 °C. Cu toate acestea, pentru nici un test, temperatura nu trebuie să varieze, dacă se poate, cu mai mult de 2 °C în limitele specificate (de exemplu, 18-20, 19-21 sau 20-22 °C). S-ar putea să fie necesară utilizarea unui vas experimental suplimentar pentru urmărirea temperaturii.

1.8.1.7. *Aerarea*

Vasele experimentale nu se aerează în timpul testului.

1.8.2. **Concentrația experimentată**

În mod normal, trebuie să existe cel puțin cinci concentrații experimentate aranjate în serie geometrică cu un factor de separare de maximum 3,2 și trebuie să se utilizeze numărul optim de probe identice pentru fiecare concentrație experimentată (a se vedea punctul 1.8.1.3). Dacă se utilizează mai puțin de cinci concentrații, acest lucru se justifică. Substanțele nu se testează la concentrații mai mari decât limita de solubilitate a acestora în mediul experimental.

La stabilirea domeniului de concentrații, trebuie să se rețină următoarele:

(i) dacă se urmărește obținerea CMEO/CFEO, cea mai mică concentrație experimentată trebuie să fie suficient de mică, astfel încât fecunditatea la această concentrație să nu fie cu mult mai mică decât aceea din martor. Dacă nu este așa, testul va trebui să fie repetat cu concentrația cea mai mică redusă;

(ii) dacă se urmărește obținerea CMEO/CFEO, cea mai mare concentrație experimentată trebuie să fie suficient de mare, astfel încât fecunditatea la această concentrație să fie cu mult mai mică decât aceea din martor. Dacă nu este așa, testul va trebui să fie repetat cu concentrația cea mai mare sporită;

(iii) dacă se determină EC_x pentru efectele asupra reproducerii, se recomandă utilizarea unor concentrații suficiente pentru stabilirea EC_x cu un nivel corespunzător de siguranță. Dacă se determină EC_{50} pentru efectele asupra reproducerii, se recomandă ca cea mai mare concentrație experimentată să fie mai mare decât EC_{50} menționat. În caz contrar, deși va fi posibilă încă determinarea EC_{50}, intervalul de siguranță pentru EC_{50} va fi foarte larg și s-ar putea să nu fie posibil să se aprecieze dacă modelul este cel indicat;

(iv) este de preferat ca valorile concentrației experimentate să nu includă concentrații care au efect important din punct de vedere statistic asupra supraviețuirii adulților, deoarece acest lucru ar modifica natura testului de la un test pur și simplu de reproducere la un test combinat de reproducere și mortalitate care necesită o analiză statistică mult mai complexă.

Cunoașterea în prealabil a toxicității substanței testate (de exemplu, dintr-un test de toxicitate acută și din studii de găsire a domeniului) ar fi utilă în selectarea concentrațiilor optime pentru test.

Dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru a facilita prepararea soluțiilor experimentale (a se vedea punctul 1.6.4), concentrația acestuia în vasele experimentale nu trebuie să fie mai mare de 0,1 ml/l și trebuie să fie aceeași în toate vasele.

1.8.3. **Probele martor**

În afară de seria pentru test, se mai realizează o serie de probe martor pentru mediul experimental și, de asemenea, dacă este relevant, o serie de probe martor care conțin solventul sau agentul de dispersie. Dacă se utilizează, concentrația solventului sau agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele ce conțin substanța testată. Se utilizează numărul optim de probe identice (a se vedea punctul 1.8.1.3).

În general, într-un test bine realizat, coeficientul de variație în jurul numărului mediu de progenituri vii obținute per animal părinte în proba (probele) martor este ≤ 25 % și acest lucru se consemnează în protocoalele testului care utilizează animale ținute separat.

1.8.4. **Reînnoirea mediului experimental**

Frecvența reînnoirii mediului experimental depinde de stabilitatea substanței testate, dar trebuie să fie de cel puțin trei ori pe săptămână. Dacă, din testele preliminare de stabilitate (a se vedea punctul 1.4), concentrația substanței testate nu este stabilă (adică nu se încadrează în intervalul 80-120 %) din valoarea nominală sau este mai mică de 80 % din concentrația inițială măsurată) în perioada maximă de reînnoire (adică trei zile), trebuie să se aibă în vedere o reînnoire mai frecventă a mediului sau să se utilizeze un test în flux continuu.

Când un mediu este reînnoit în teste semistatice, se pregătește o a doua serie de vase experimentale și animalele părinți se transferă în acestea cu ajutorul, de exemplu, unei pipete de sticlă cu un diametru potrivit. Volumul mediului transferat cu dafnia trebuie să fie minim.

1.8.5. **Observații**

Rezultatele observațiilor făcute în timpul testului se consemnează în fișe tehnice (a se vedea exemple în apendicele 3 și 4). Dacă sunt necesare alte măsurători (a se vedea 1.3 și 1.8.8), s-ar putea să fie necesare observații suplimentare.

1.8.6. **Progeniturile**

Progeniturile produse de fiecare animal părinte se scot de preferință și se numără zilnic de la apariția primilor pui, pentru a preveni consumarea de către aceștia a hranei destinate adulților. În sensul prezentei metode, se numără doar numărul de progenituri vii, dar se consemnează și prezența ouălor avortate sau a progeniturilor decedate.

1.8.7. **Mortalitatea**

Mortalitatea în rândul animalelor părinți se înregistrează de preferință zilnic, cel puțin de câte ori se numără progeniturile.

1.8.8. **Alți parametri**

Deși prezenta metodă este destinată în principal evaluării efectelor asupra reproducerii, este posibil să se poată măsura și alte efecte suficient pentru a permite o analiză statistică. Măsurătorile de creștere sunt de dorit în mare măsură, deoarece oferă date privind posibilele efecte subletale, care s-ar putea să fie mai utile decât determinarea doar a reproducerii; se recomandă măsurarea lungimii animalelor părinți (adică lungimea corpului, fără înotătoarea caudală, la sfârșitul testului. Alți parametri care se pot măsura sau calcula includ timpul de producere a primului pui (și a puilor ulteriori), numărul și dimensiunea puilor per animal, numărul de pui avortați, prezența masculilor sau ephippia și rata intrinsecă a creșterii populației.

1.8.9. **Frecvența determinărilor și măsurătorilor analitice**

Este necesar să se măsoare concentrația oxigenului, temperatura, duritatea și valorile pH-ului cel puțin o dată pe săptămână, în mediile proaspete și cele vechi, în proba (probele) martor și în concentrațiile cele mai mari de substanță testată.

În timpul testului, se determină concentrația substanței testate la intervale regulate.

În testele semistatice, unde se estimează o menținere a concentrației substanței testate în limitele de ± 20 % din cea nominală (adică în intervalul de 80-120 % – a se vedea 1.4 și 1.8.4), se recomandă analizarea cel puțin a celei mai mari și a celei mai mici concentrații experimentate, atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și când sunt reînnoite în timpul primei săptămâni de testare (adică analizele se realizează pe o probă din aceeași soluție - atunci când este proaspăt preparată și la reînnoire). Ulterior, determinările respective se repetă la intervale de cel puțin o săptămână.

Pentru testele în care nu se estimează menținerea concentrației substanței testate în limitele de ± 20 % din cea nominală, este necesară analizarea tuturor concentrațiilor experimentate, atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și la reînnoire. Cu toate acestea, pentru acele teste în care concentrația inițială măsurată a substanței testate nu se situează în limitele de ± 20 % din cea nominală, dar se pot aduce dovezi care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (adică în intervalul de 80-120 % din concentrațiile inițiale), determinarea chimică se poate reduce în săptămânile 2 și 3 de testare la cea mai mare și cea mai mică concentrație experimentată. În toate cazurile, este necesar să se determine concentrațiile substanței testate înaintea reînnoirii doar la un vas din cele identice pentru fiecare concentrație experimentată.

Dacă se utilizează un test cu flux continuu, se recomandă un regim de prelevare a probelor similar cu cel descris pentru testele semistatice (dar măsurarea soluțiilor „vechi" nu se aplică în acest caz). Cu toate acestea, ar putea fi recomandabil să se crească numărul prelevărilor de probe în prima săptămână (de exemplu, trei seturi de măsurători) pentru a asigura menținerea stabilității concentrațiilor experimentale.La aceste tipuri de testări, trebuie verificat zilnic fluxul diluantului și al substanței testate.

Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței testate în limitele de ± 20 % din cea nominală sau măsurată inițial, atunci rezultatele se pot obține din valoarea nominală sau din cea măsurată inițial. Dacă abaterea de la concentrația nominală sau cea măsurată inițial este mai mare de ± 20 %, este necesar ca rezultatele să se exprime în funcție de media ponderată în timp (a se vedea apendicele 5).

2. REZULTATELE ȘI PREZENTAREA ACESTORA

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Scopul prezentului test îl constituie determinarea efectului substanței testate asupra numărului total de progenituri vii produse per animal părinte în viață la sfârșitul testului. Numărul total de progenituri per animal părinte se calculează pentru fiecare vas experimental (adică proba repetată). Dacă, în fiecare probă repetată, animalul părinte moare în timpul testului sau se dovedește a fi mascul, atunci proba repetată se exclude din analiză. Analiza se va face atunci pentru un număr redus de probe identice.

Pentru estimarea CMEO și, prin urmare, a CFEO, pentru efectele substanței chimice asupra capacității de reproducere, este necesar să se calculeze capacitatea medie de reproducere pentru toate probele identice pentru fiecare concentrație și deviație standard remanentă comună și acest lucru se poate realiza prin analiza de varianță (ANOVA). Apoi, media pentru fiecare concentrație se compară cu media probelor martor, utilizând o metodă potrivită de comparare multiplă. Ar putea să fie utile testul Dunnett sau Williams (14) (15) (16) (17). Este necesar să se verifice dacă estimarea ANOVA de varianță uniformă este valabilă. Se recomandă ca acest lucru să se facă mai degrabă grafic decât printr-un test de importanță oficială (18); o variantă potrivită este efectuarea unui test Barlett. Dacă această estimare (ANOVA) nu este valabilă, atunci ar trebui să se aibă în vedere transformarea datelor pentru a omogeniza variațele înaintea efectuării ANOVA sau + efectuarea unei ANOVA ponderate. Se calculează și se prezintă dimensiunea efectului detectabil prin utilizarea ANOVA (adică diferența cea mai puțin importantă).

Pentru estimarea concentrației care ar putea să genereze o reducere de 50 % a capacității de reproducere (adică EC_{50}), trebuie să se realizeze o reprezentare grafică corespunzătoare a datelor, de exemplu printr-o curbă logaritmică, utilizând o metodă statistică cum ar fi metoda celor mai mici pătrate. Curba ar putea să fie bine caracterizată în funcție de parametri, astfel încât să se poată determina direct EC_{50} și eroarea sa standard. Aceasta ar ușura mult calcularea limitelor de încredere pentru EC_{50}. Cu excepția cazului în care există motive întemeiate să se prefere limite de încredere diferite, se fixează limite de încredre de 95 % de ambele părți. Este preferabil ca procedeul de trasare a curbei să ofere un mijloc pentru evaluarea semnificației ajustării incomplete. Acest lucru se poate realiza grafic sau prin împărțirea sumei remanente de pătrate în „ajustare incompletă" și „componente de eroare pură" și prin efectuarea unui test de importanță pentru ajustarea incompletă. Deoarece există posibilitatea ca tratamentele care dau o fecunditate mare să aibă o varianță mai mare a numărului de animale tinere produse decât tratamentele care dau o fecunditate mică, trebuie să se aibă în vedere ponderarea valorilor observate pentru a reflecta variațele diferite din grupele tratate diferit [a se vedea referința bibliografică (18) pentru date de bază].

Din analiza datelor din testul final de intercalibrare (2), s-a trasat o curbă logaritmică cu ajutorul modelului prezentat în continuare, deși se pot utiliza și alte modele:

$$Y = \frac{c}{1+\left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

unde:

Y: numărul total de animale tinere per animal părinte în vaiță la sfârșitul testului (calculat pentru fiecare vas)

x: concentrația substanței

c: numărul preconizat de animale tinere atunci când x = 0

x_0: EC_{50} în populație

b: panta curbei

Se pare că acest model este adecvat unui număr mare de situații, dar există teste pentru care nu este potrivit. Este necesară verificarea validității modelului recomandat anterior. În unele cazuri, se poate să fie potrivit modelul hormetic, în care concentrațiile mici generează efecte sporite (19).

Se mai pot estima și alte concentrații de efect, de exemplu, EC_{10} sau EC_{20}, deși ar fi preferabil să se utilizeze o caracterizare funcție de parametri a modelului diferită de cea utilizată la determinarea EC_{50}.

2.2. RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să includă următoarele:

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

— date de identificare chimică, inclusiv puritatea.

2.2.2. **Speciile experimentale:**

— clonul (dacă a fost caracterizat genetic, astfel încât să corespundă speciei), furnizorul sau sursa (dacă se cunoaște) și condițiile de cultură utilizate. Dacă se utilizează o specie diferită de *Daphnia magna*, acest lucru se consemnează și se justifică.

2.2.3. **Condițiile experimentale:**

— modul de lucru utilizat (de exemplu, semistatic sau în flux continuu, volumul, încărcarea în număr de dafnia pe litru);

— timpul de expunere la lumină și intensitatea luminii;

— protocolul testului (de exemplu, numărul de probe identice, numărul de părinți pentru fiecare probă repetată);

— detalii privind mediul de cultură utilizat;

— adaosurile de material organic, dacă se practică, inclusiv compoziția, sursa, metoda de preparare, raportul COT/CCO al amestecurilor preparate, determinarea raportului COT/CCO rezultat în mediul experimental;

— date detaliate privind hrana, inclusiv cantitatea (în mg C/dafnia/zi) și programul [de exemplu, tipul hranei, care include pentru alge denumirea specifică (specia) și, dacă se cunoaște, familia, condițiile de cultură];

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (dacă se utilizează un solvent sau agent de dispersie, concentrația acestora).

2.2.4. **Rezultatele:**

— rezultatele oricăror studii preliminare privind stabilitatea substanței testate;

— concentrațiile nominale experimentate și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței testate în vasele experimentale (a se vedea fișele tehnice din apendicele 4); de asemenea, se prezintă eficiența de regenerare a metodei și limita determinării;

— calitatea apei din vasele experimentale (adică pH, temperatura și concentrația oxigenului dizolvat, COT și CCO și duritatea, dacă este cazul;

— fișa completă cu progeniturile vii pentru fiecare animal părinte (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 3);

— numărul de decese printre animalele părinți și ziua în care au avut loc (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 3);

— coeficientul de variație pentru fecunditatea martorului (pe baza numărului total de progenituri vii per animal părinte în viață la sfârșitul testului);

— reprezentarea grafică a numărului total de progenituri vii per animal părinte (pentru fiecare probă identică) în viață la sfârșitul testului în funcție de concentrația substanței testate;

— concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO) pentru reproducere, care include o descriere a metodelor statistice utilizate și indicarea dimensiunii efectului care ar putea să fie detectat și concentrația la care nu se observă nici un efect (CFEO) pentru reproducere; dacă este cazul, se consemnează și raportul LOEC/CFEO pentru mortalitatea animalelor părinți;

— dacă este cazul, EC_x pentru reproducere cu intervalele de încredere și reprezentarea grafică a modelului utilizat pentru calculul acesteia, panta curbei doză-răspuns și erorile standard ale acesteia;

— alte efecte biologice observate sau măsurători: se consemnează orice alte efecte biologice care au fost observate sau măsurate (de exemplu, creșterea animalelor părinți), inclusiv o justificare corespunzătoare;

— explicarea oricărei abateri de la modul de lucru.

3. **BIBLIOGRAFIE**

(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 I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

(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. J. 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.

APENDICELE 1

PREPARAREA MEDIILOR ELENDT M7 ŞI M4 COMPLET DETERMINATE

Adaptarea la mediile Elendt M7 și M4

Unele laboratoare au întâmpinat dificultăți la transferul direct al dafniei în mediile M4 (1) și M7. Cu toate acestea, s-au obținut unele succese în adaptarea treptată, adică transferul din mediul propriu în 30 % Elendt, apoi 60 % Elendt și apoi în 100 % Elendt. Perioadele de adaptare pot să fie de o lună.

PREPARAREA

Microelementele

Se prepară mai întâi soluții mamă separate (I) ale fiecărui microelement în apă de puritate corespunzătoare de exemplu deionizată, distilată sau purificată prin osmoză inversă. Din soluțiile mamă menționate (I), se prepară o soluție mamă unică (II), care conține toate microelementele (soluție combinată), adică:

Soluțiile mamă I (o singură substanță)	Cantitatea adăugată în apă (mg/l)	Concentrația (în funcție de mediul M4) (multiplu)	Pentru prepararea soluției mamă combinate II, se adaugă următoarea cantitate de soluție mamă I în apă (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	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
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	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_2 EDTA $\cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000	-	-
Fe $SO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000	-	-

Atât soluțiile de Na_2 EDTA cât și de Fe SO_4 se prepară separat, se toarnă împreună și se autoclavizează imediat. Rezultă:

soluția 21 Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

Mediile M4 și M7

Mediile M4 și M7 se prepară din soluția mamă II, macroelemente nutritive și vitamine, după cum urmează:

	Cantitatea adăugată în apă (mg/l)	Concentrația (în funcție de mediul M4) (multiplu)	Cantitatea de soluție mamă adăugată pentru prepararea mediului (ml/l)	
			M4	M7
Microelementele combinate în soluția mamă II		20	50	50
Soluțiile mamă cu macroelemente nutritive (o singură substanță)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	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
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	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
Soluție combinată de vitamine	-	10 000	0,1	0,1
Soluția mamă combinată de vitamine se prepară prin adăugarea celor 3 vitamine la 1 litru de apă conform indicațiilor prezentate în continuare.				
Clorhidrat de tiamină	750	10 000	-	-
Cianocobalamină (B_{12})	10	10 000	-	-
Biotină	7,5	10 000	-	-

Soluția combinată de vitamine se păstrează înghețată în mici alicoți. Vitaminele se adaugă în medii cu puțin timp înaintea utilizării.

Note: Pentru a evita precipitarea sărurilor în timpul preparării mediilor complete, se adaugă alicoți de soluții mamă în aproximativ 500-800 ml apă deionizată și apoi se aduce la un litru.

Prima semnalare a mediului M4 se poate găsi în Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal demage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

APENDICELE 2

ANALIZA CONȚINUTULUI DE CARBON ORGANIC TOTAL (COT) ȘI REALIZAREA UNEI NOMOGRAME PENTRU CONȚINUTUL COT DIN HRANA PE BAZĂ DE ALGE

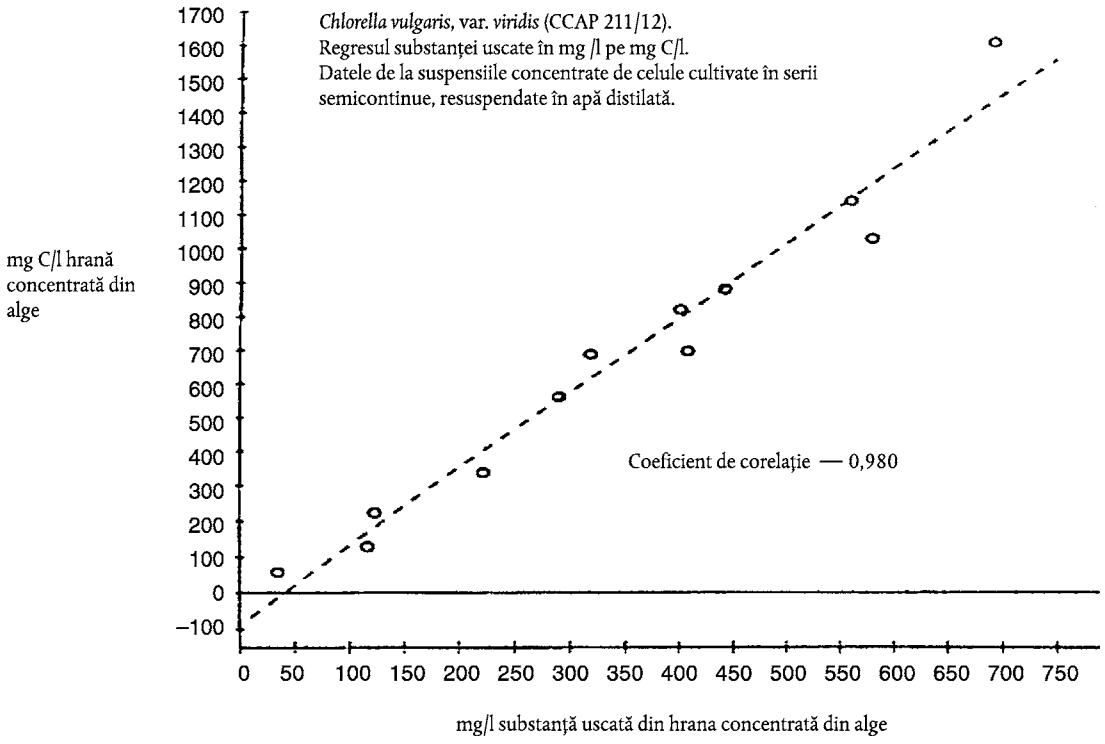
Se acceptă ca măsurarea conținutului de carbon din hrana pe bază de alge să nu se măsoare în mod normal direct, ci din corelările (adică nomogramele) cu măsurile înlocuitoare, de exemplu numărul celulelor de alge sau absorbanța luminii).

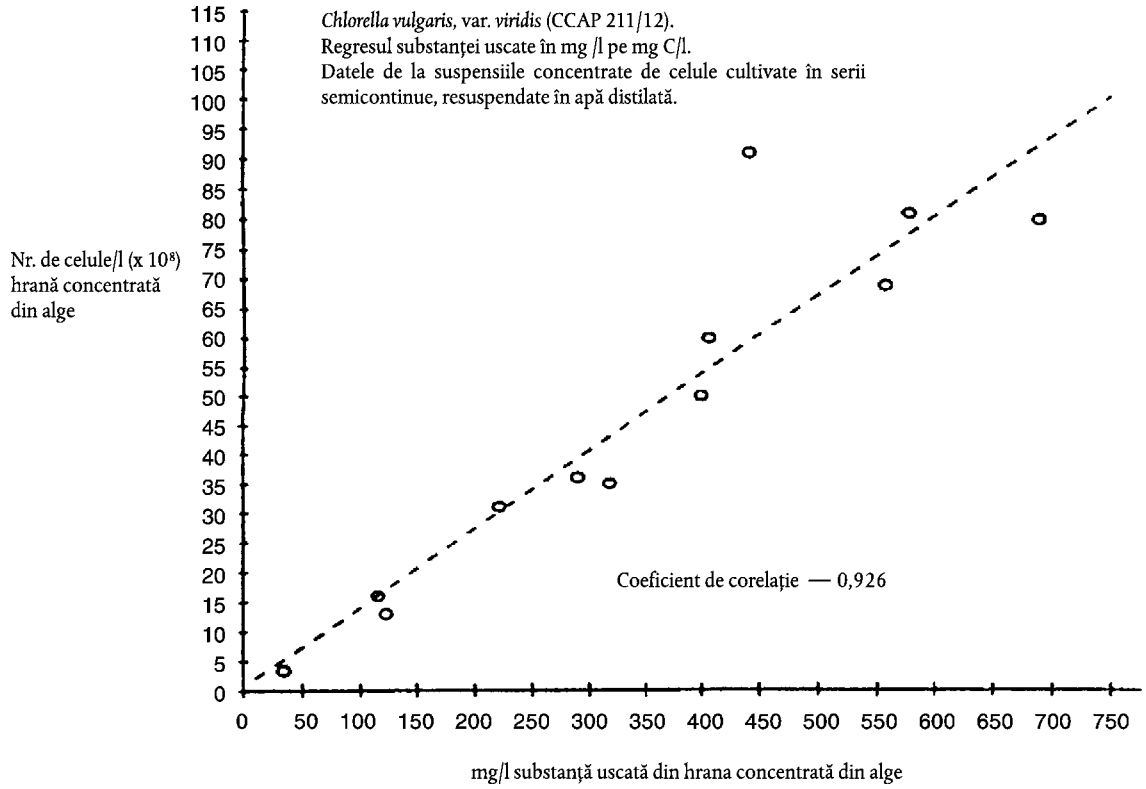
Este necesar ca măsurarea COT să se efectueze mai degrabă prin oxidare la temperatură mare decât prin metodele UV sau cu persulfat. (a se vedea: Determinarea carbonului organic total, a consumului total de oxigen și a determinanților conecși cu ajutorul instrumentelor 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, Londin WC1V 6HB).

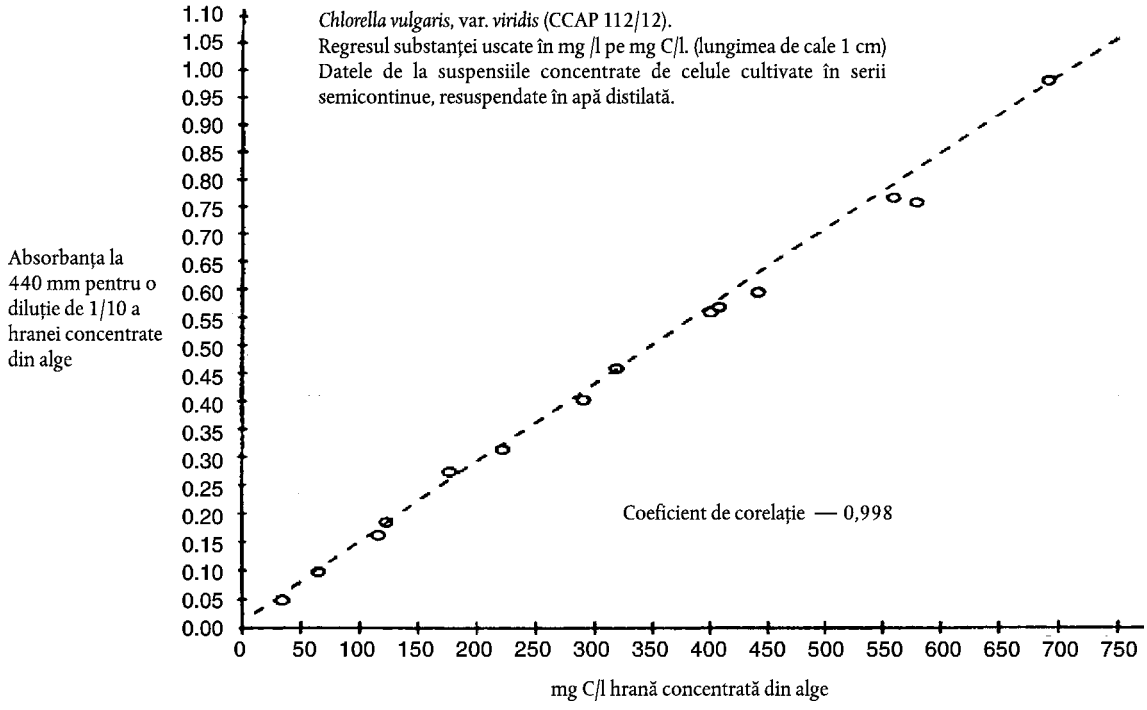
Pentru obținerea nomogramelor, algele se separă din mediul de cultură prin centrifugare urmată de resuspensie în apă distilată. Se determină parametrul înlocuitor și concentrația COT în fiecare probă de trei ori. Se analizează probele oarbe în apă distilată și concentrația COT se scade din concentrația COT din proba de alge.

Nomogramele trebuie să fie liniare în domeniul necesar de concentrații ale carbonului. Exemplele sunt prezentate în continuare.

NB: Nomogramele nu se utilizează pentru conversiune; este esențial ca laboratoarele să-și elaboreze propriile nomograme.




Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).
Regresul substanței uscate în mg /l pe mg C/l.
Datele de la suspensiile concentrate de celule cultivate în serii semicontinue, resuspendate în apă distilată.
Nr. de celule/l (x 10⁸) hrană concentrată din alge
Coeficient de corelație — 0,926
mg/l substanță uscată din hrana concentrată din alge


Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 112/12).
Regresul substanței uscate în mg /l pe mg C/l. (lungimea de cale 1 cm)
Datele de la suspensiile concentrate de celule cultivate în serii semicontinue, resuspendate în apă distilată.
Absorbanța la 440 mm pentru o diluție de 1/10 a hranei concentrate din alge
Coeficient de corelație — 0,998
mg C/l hrană concentrată din alge

APENDICELE 3

EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA REÎNNOIRII MEDIULUI, DATELE CONTROLULUI FIZIC/CHIMIC, ADMINISTRAREA HRANEI, REPRODUCEREA DAFNIEI ȘI MORTALITATEA ADULȚILOR

Nr. experimentări: Început la data: Clonul: Mediul: Tipul hranei: Substanța testată: Conc. nominală:

Zi	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Reînnoirea mediului (se bifează)																								
PH (1)																							nou	
																							vechi	
O_2 mg/l (1)																							nou	
																							vechi	
Temperatura (°C) (1)																							nou	
																							vechi	
Hrana administrată (se bifează)																								
Număr progenituri vii (se bifează) (2)																								Total
Vasul 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalitatea cumulativă a adulților (3)																								

(1) Se indică vasul care s-a utilizat pentru experimentare.
(2) Mortalitatea animalelor adulte se consemnează cu „M" în căsuța respectivă.
(3) Puii avortați se consemnează cu „AV" în căsuța respectivă.

APENDICELE 4

EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA REZULTATELOR ANALIZEI CHIMICE

(a) **Concentrațiile măsurate**

Conc. nominală	Proba din săptămâna 1		Proba din săptămâna 2		Proba din săptămâna 3	
	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche

(b) **Concentrațiile măsurate sub formă de procente din cea nominală**

Conc. nominală	Proba din săptămâna 1		Proba din săptămâna 2		Proba din săptămâna 3	
	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche

APENDICELE 5

CALCULAREA MEDIEI PONDERATE DE TIMP

Media ponderată de timp

Deoarece concentrația substanței testate poate să scadă în intervalul de timp dintre reînnoiri, este necesar să se aibă în vedere necesitatea alegerii unei concentrații reprezentative pentru domeniul de concentrații experimentate cu dafnia părinți. Alegerea se face pe principii biologice, cât și statistice. De exemplu, dacă se consideră că reproducerea este afectată cel mai mult de concentrația de vârf experimentată, atunci trebuie să se utilizeze concentrația maximă. Cu toate acestea, dacă se consideră că efectul acumulat sau pe termen lung al substanței toxice este mai important, atunci o concentrație medie este mai relevantă. În cazul respectiv, o medie potrivită pentru utilizare este concentrația medie ponderată de timp, deoarece ține seama de variația concentrației instantanee în timp.

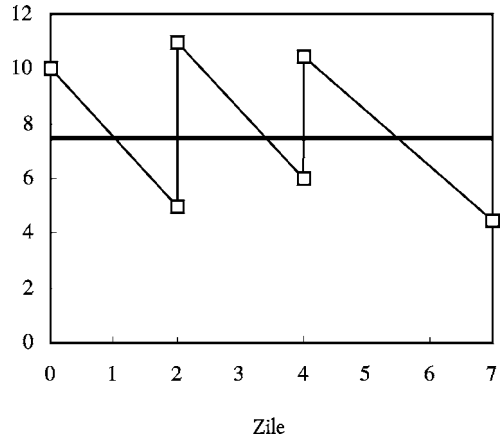


Fig. 1: Exemplu de medie ponderată de timp

Figura 1 prezintă un exemplu de test (simplificat) cu durata de șapte zile cu reînnoirea mediului în zilele 0, 2 și 4.

— Linia subțire în zigzag reprezintă concentrația în orice punct în timp. Se consideră că scăderea concentrației este urmarea unui proces de descompunere exponențială.

— Cele șase puncte reprezentate grafic arată concentrațiile observate, măsurate la începutul și sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.

— Linia continuă groasă indică poziția mediei ponderate de timp.

Media ponderată de timp se calculează, astfel încât aria de sub media ponderată de timp să fie egală cu aria de sub curba concentrațiilor. Calculul pentru exemplul anterior se prezintă în tabelul 1.

Tabelul 1: Calculul mediei ponderate de timp

Reînnoirea nr.	Zile	Conc. 0	Conc. 1	Ln(Conc. 0)	Ln(Conc. 1)	Aria
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
Total zile: 7					Aria totală	50,091
					Media PT	7,156

„Zile” este numărul de zile din perioada de reînnoire.
„Conc. 0” este concentrația măsurată la începutul fiecărei perioade de reînnoire.
„Conc. 1” este concentrația măsurată la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.
„Ln(Conc. 0)” este logaritmul natural al Conc. 0.
„Ln(Conc. 1)” este logaritmul natural al Conc. 1.
„Aria” este aria de sub curba exponențială pentru fiecare perioadă de reînnoire. Se calculează cu:

$$\text{Aria} = \frac{\text{Conc.0- Conc. 1}}{\text{Ln(Conc. 0)-Ln(Conc. 1)}} \times \text{Zile}$$

Media ponderată de timp („media PT”) este „Aria totală” împărțită la „Total zile”.

Desigur, pentru testul de reproducere a dafniei, tabelul trebuie mărit până la 21 de zile.

Este clar că atunci când observațiile se fac numai la începutul și sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire, nu se poate confirma că procesul de descompunere este, de fapt, exponențial. O curbă diferită ar genera un calcul diferit pentru „Arie”. Cu toate acestea, un proces de descompunere exponențială nu este neverosimil și este probabil cea mai bună curbă de utilizat în absența altor date.

Cu toate acestea, este necesar să se procedeze cu prudență, dacă la analiza chimică nu se reușește să se găsească nici o substanță la sfârșitul perioade I de reînnoire. Cu excepția cazului în care este posibil să se estimeze rapiditatea dispariției substanței din soluție, este imposibil să se obțină o arie realistă sub curbă și, prin urmare, este imposibil să se obțină o medie ponderată de timp rezonabilă.

ANEXA 6

ANEXA VI

CRITERII GENERALE PRIVIND CLASIFICAREA ȘI ETICHETAREA SUBSTANȚELOR ȘI PREPARATELOR PERICULOASE

Cuprins

1.	INTRODUCERE GENERALĂ
2.	CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE
2.1.	Introducere
2.2.	Criteriile pentru clasificare, alegerea simbolurilor, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc
2.2.1.	Exploziv
2.2.2.	Oxidant
2.2.3.	Foarte inflamabil
2.2.4.	Ușor inflamabil
2.2.5.	Inflamabil
2.2.6.	Alte proprietăți fizico-chimice
3.	CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE PROPRIETĂȚILE TOXICOLOGICE
3.1.	Introducere
3.2.	Criteriile pentru clasificare, alegerea simbolurilor, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc
3.2.1.	Foarte toxic
3.2.2.	Toxic
3.2.3.	Nociv
3.2.4.	Observații privind utilizarea R48
3.2.5.	Corosiv
3.2.6.	Iritant
3.2.7.	Sensibilizare
3.2.8.	Alte proprietăți toxicologice
4.	CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE EFECTELE SPECIFICE ASUPRA SĂNĂTĂȚII OAMENILOR
4.1.	Introducere
4.2.	Criteriile pentru clasificare, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc
4.2.1.	Substanțe cancerigene
4.2.2.	Substanțe mutagene
4.2.3.	Substanțe toxice pentru reproducere
4.2.4.	Procedeu de clasificare a preparatelor în funcție de efectele specifice asupra sănătății

5. CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE EFECTELE ASUPRA MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR

5.1. Introducere

5.2. Criteriile pentru clasificare, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc

5.2.1. Mediul acvatic

5.2.2. Mediul neacvatic

6. ALEGEREA FRAZELOR CU RECOMANDĂRI DE PRUDENȚĂ

6.1. Introducere

6.2. Fraze de prudență pentru substanțe și preparate

7. ETICHETAREA

8. CAZURI SPECIALE: Substanțe

8.1. Butelii mobile de gaz

8.2. Recipiente de gaz pentru propan, butan sau gaz petrolier lichefiat (GPL)

8.3. Metale sub formă solidă

8.4. Substanțe clasificate cu R65

9. CAZURI SPECIALE: Preparate

9.1. Preparate gazoase (amestecuri de gaze)

9.2. Recipiente de gaze pentru preparate odorizante ce conțin propan, butan sau gaz petrolier lichefiat (GPL)

9.3. Aliaje, preparate ce conțin polimeri, preparate ce conțin elastomeri

9.4. Preparate clasificate cu R65

9.5. Peroxizi organici

9.6. Dispoziții suplimentare de etichetare pentru anumite preparate

SPECIFICAȚIILE COMISIEI

1. INTRODUCERE GENERALĂ

1.1. Scopul clasificării este identificarea tuturor proprietăților fizico-chimice, toxicologice și ecotoxicologice ale substanțelor și preparatelor care pot să constituie un risc în timpul manipulării sau folosirii normale a acestora. După identificarea unor proprietăți periculoase, substanța sau preparatul trebuie să se eticheteze pentru a se indica pericolul (pericolele) în vederea protejării utilizatorului, publicului general și mediului înconjurător.

1.2. Prezenta anexă stabilește principiile generale care reglementează clasificarea și etichetarea substanțelor și preparatelor menționate la articolul 4 din prezenta directivă și în articolul 4 din Directiva 1999/45/CE și alte directive relevante privind preparatele periculoase.

Aceasta se adresează tuturor celor interesați (producători, importatori, autorități naționale) de metodele de clasificare și etichetare a substanțelor și preparatelor periculoase.

1.3. Dispozițiile prezentei directive și ale Directivei 1999/45/CE sunt destinate să ofere un prim ajutor prin care publicul general și persoanele la locul de muncă să primească informațiile esențiale referitoare la substanțele și preparatele periculoase. Eticheta atrage atenția peroanelor care manipulează sau utilizează substanțe și preparate asupra pericolului inerent al anumitor materiale de acest tip.

Eticheta mai poate servi la atragerea atenției asupra unor informații mai cuprinzătoare despre produs, privind securitatea și utilizarea, disponibile în alte forme.

1.4. Eticheta ia în considerare toate pericolele posibile care se pot întâlni în manipularea și utilizarea normală a substanțelor și preparatelor periculoase în forma în care se află când sunt introduse pe piață, dar nu neapărat în orice altă formă în care se pot utiliza în final, de exemplu diluate. Cele mai grave pericole sunt marcate prin simboluri, aceste pericole precum și cele pe care le prezintă alte proprietăți periculoase se specifică prin fraze de risc, iar frazele de prudență conțin recomandările de prudență necesare.

Pentru substanțe, informațiile sunt completate cu denumirea substanței conform nomenclaturii recunoscute la nivel internațional, denumirea preferată fiind cea utilizată în Inventarul european al substanțelor chimice existente introduse pe piață (IESCE) sau în Lista europeană a substanțelor chimice notificate (ELINCS), numărul CE și numele, adresa și numărul de telefon al persoanei stabilite în Comunitate care răspunde de introducerea substanței pe piață.

Pentru preparate, informațiile conform articolului 10 alineatul (2) din Directiva 1999/45/CE se completează cu următoarele date:

— denumirea comercială sau destinația preparatului;

— denumirea chimică a substanței sau substanțelor din preparat și

— numele, adresa completă și numărul de telefon al persoanei stabilite în Comunitate care răspunde de introducerea preparatului pe piață.

1.5. În temeiul articolului 6, producătorii, distribuitorii și importatorii substanțelor periculoase care apar în IESCE, dar care nu au fost încă introduse în anexa I, sunt obligați să facă o investigație pentru a fi la curent cu datele relevante și accesibile existente, referitoare la proprietățile acestor substanțe. Pe baza informațiilor respective, aceștia ambalează și etichetează provizoriu substanțele de acest tip conform normelor stabilite în articolele 22-25 și criteriilor din prezenta anexă.

1.6. **Datele necesare pentru clasificare și etichetare**

1.6.1. Pentru substanțe, datele necesare pentru clasificare și etichetare se pot obține:

(a) referitor la substanțele pentru care sunt necesare informațiile specificate în anexa VII, majoritatea datelor necesare pentru clasificare și etichetare apar în „setul de bază". Acest tip de clasificare și etichetare trebuie revizuit, dacă este necesar, atunci când există informații suplimentare (anexa VIII);

(b) referitor la alte substanțe (de exemplu, cele menționate la punctul 1.5), datele necesare pentru clasificare și etichetare se pot obține, dacă este necesar, din alte surse, de exemplu:

— rezultatele testelor anterioare;

— informațiile solicitate de normele internaționale privind transportul substanțelor periculoase;

— informațiile luate din lucrările de referință și din literatura de specialitate sau

— informațiile rezultate din experiența practică.

Dacă este cazul, se pot lua în considerare și rezultatele relațiilor structură-activitate validate și aprecierea specialiștilor.

1.6.2. Pentru preparate, datele necesare pentru clasificare și etichetare se pot obține în mod normal:

(a) dacă acestea sunt date fizico-chimice, prin aplicarea metodelor specificate în anexa V. Acest lucru este valabil și pentru preparatele reglementate de Directiva 91/414/CEE, cu excepția cazului în care se pot accepta alte metode recunoscute la nivel internațional, în conformitate cu dispozițiile din anexele II și III la Directiva 91/414/CEE [articolul 5 alineatul (5) din Directiva 1999/45/CE]. Pentru preparatele gazoase se poate utiliza o metodă de calcul pentru proprietățile de inflamabilitate și oxidante (a se vedea 9.1.1.1 și 9.1.1.2). Pentru preparatele negazoase, ce conțin peroxizi organici, se poate utiliza o metodă de calcul pentru proprietățile oxidante (a se vedea 2.2.2.1);

(b) dacă acestea sunt date privind efectele asupra sănătății:

— prin aplicarea metodelor specificate în anexa V, cu excepția cazului în care, pentru produsele de protecție a plantelor, se pot accepta alte metode recunoscute la nivel internațional, în conformitate cu dispozițiile din anexele II și III la Directiva 91/414/CEE [articolul 6 alineatul (1) litera (b) din Directiva 1999/45/CE];

— și prin aplicarea unei metode convenționale menționate la articolul 6 din și la anexa II părțile A.1-6 și B.1-5 la Directiva 1999/45/CE sau

— pentru R65, prin aplicarea normelor prevăzute la 3.2.3;

— totuși dacă acestea se referă la evaluarea proprietăților cancerigene, mutagene și de toxicitate pentru reproducere, prin aplicarea unei metode convenționale menționate la articolul 6 din și la anexa II părțile A.7-9 și B.6 la Directiva 1999/45/CE;

(c) dacă acestea sunt date privind proprietățile ecotoxicologice:

(i) doar pentru toxicitatea acvatică:

— prin aplicarea metodelor specificate în anexa V, conform condițiilor menționate la anexa III partea C la Directiva 1999/45/CE, cu excepția cazului în care, pentru produsele de protecție a plantelor, se pot accepta alte metode recunoscute la nivel internațional, în conformitate cu dispozițiile din anexele II și III la Directiva 91/414/CEE [articolul 7 alineatul (1) litera (b) din Directiva 1999/45/CE] sau

— prin aplicarea unei metode convenționale menționate la articolul 7 din și în anexa III părțile A și B, la Directiva 1999/45/CE;

(ii) pentru evaluarea bioacumulării posibile (sau reale), prin determinarea log P_{oa} (sau BCF) sau evaluarea capacității de degradare, prin aplicarea unei metode convenționale menționate la articolul 7 din și în anexa III părțile A și B, la Directiva 1999/45/CE;

(iii) pentru pericolele pentru stratul de ozon, prin aplicarea unei metode convenționale menționate la articolul 7 din și anexa III, părțile A și B, la Directiva 1999/45/CE.

Notă referitoare la realizarea testelor pe animale:

Testele pe animale, pentru stabilirea datelor experimentale se realizează în conformitate cu dispozițiile din Directiva 86/609/CEE referitoare la protecția animalelor utilizate la experimentări.

Notă referitoare la proprietățile fizico-chimice:

Pentru peroxizii organici și preparatele cu peroxizi organici, datele se pot obține prin metoda de calcul stabilită la punctul 9.5. Pentru preparatele gazoase, se poate utiliza o metodă de calcul pentru proprietățile de inflamabilitate și oxidante (a se vedea punctul 9).

1.7. **Aplicarea criteriilor orientative**

Clasificarea trebuie să aibă în vedere proprietățile fizico-chimice, toxicologice și ecotoxicologice ale substanțelor și preparatelor.

Clasificarea substanțelor și preparatelor se face conform punctului 1.6, pe baza criteriilor de la punctele 2-5 (substanțe) și punctele 2, 3, 4.2.4 și 5 din prezenta anexă. Trebuie să se țină seama de toate tipurile de pericole. De exemplu, clasificarea conform 3.2.1 nu înseamnă ignorarea unui punct ca 3.2.2 sau 3.2.4.

Alegerea simbolului (simbolurilor) și frazei (frazelor) de risc se face în funcție de clasificare pentru a garanta specificarea pe etichetă a naturii specifice a pericolelor posibile identificate în clasificare.

Fără a aduce atingere criteriilor prevăzute la 2.2.3, 2.2.4 și 2.2.5, substanțele și preparatele sub formă de aerosoli se supun dispozițiilor din Directiva 75/324/CEE, astfel cum a fost modificată și adaptată la progresul tehnic.

1.7.1. Definiții

„Substanțe" reprezintă elementele chimice și compușii acestora în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, care includ orice aditiv necesar pentru menținerea stabilității produsului și orice impurități ce rezultă din procesul de producție utilizat, dar fără solventul care se poate separa fără să afecteze stabilitatea substanței sau să modifice compoziția acesteia.

O substanță poate să fie foarte bine definită din punct de vedere chimic (de exemplu, acetona) sau un amestec complex de componente de compoziții diferite (de exemplu, distilate aromate). Pentru anumite substanțe complexe s-au identificat unii componenți individuali.

„Preparate" reprezintă amestecuri de soluții compuse din două sau mai multe substanțe.

1.7.2. Aplicarea criteriilor orientative pentru substanțe

Criteriile orientative stabilite în prezenta anexă se pot aplica direct atunci când datele în discuție s-au obținut din metode de testare comparabile cu cele descrise în anexa V. În alte cazuri, datele disponibile trebuie să fie evaluate prin compararea metodelor de testare utilizate cu cele indicate în anexa V și normele specificate în prezenta anexă pentru determinarea clasificării și etichetării corespunzătoare.

În unele cazuri, pot exista îndoieli în privința aplicării criteriilor relevante, în special dacă acestea necesită aprecierea unui specialist. În aceste cazuri, este necesar ca producătorul, distribuitorul sau importatorul să clasifice și să eticheteze provizoriu substanța în urma evaluării dovezii de către o persoană competentă.

Fără a aduce atingere articolului 6, dacă a fost urmată procedura prezentată anterior și dacă se iau în considerație posibilele inconsecvențe, atunci se poate prezenta o propunere pentru introducerea clasificării provizorii în anexa I. Propunerea se face unuia din statele membre și se însoțește de datele științifice corespunzătoare (a se vedea și punctul 4.1).

Se poate utiliza o procedură similară atunci când se identifică informații care produc îngrijorare în privința acurateței unei date existente în anexa I.

1.7.2.1. *Clasificarea substanțelor ce conțin impurități, aditivi sau componente individuale*

Dacă s-au identificat impurități, aditivi sau componente individuale ale substanțelor, se iau în considerație, dacă concentrația lor este mai mare decât sau egală cu limitele specificate:

— 0,1 % pentru substanțele clasificate ca foarte toxice, toxice, cancerigene (categoria 1 sau 2), mutagene (categoria 1 sau 2), toxice pentru reproducere (categoria 1 sau 2) sau periculoase pentru mediul înconjurător (s-a atribuit simbolul „N" pentru mediul acvatic, periculoase pentru stratul de ozon);

— 1 % pentru substanțele clasificate ca periculoase, corosive, sensibilizatoare iritante, cancerigene (categoria 3), mutagene (categoria 3), toxice pentru reproducere (categoria 3) sau periculoase pentru mediul înconjurător (nu s-a atribuit simbolul „N", adică periculoase pentru organismele acvatice, pot provoca efecte negative pe termen lung),

cu excepția cazului în care, în anexa I, se specifică valori mai mici.

Cu excepția substanțelor prezentate în mod specific în lista din anexa I, clasificarea se realizează conform dispozițiilor din articolele 5, 6 și 7 din Directiva 1999/45/CE a Consiliului.

Pentru azbest (650-013-00-6) nu se aplică norma generală până la fixarea concentrației limită din anexa I. Clasificarea și etichetarea substanțelor cu conținut de azbest trebuie să se facă conform principiilor din articolul 6 din prezenta directivă.

1.7.3. Aplicarea criteriilor orientative pentru preparate

Criteriile orientative stabilite în prezenta anexă se pot aplica direct atunci când datele în discuție s-au obținut din metode de testare comparabile cu cele descrise în anexa V, cu excepția criteriilor de la punctul 4 pentru care se poate aplica numai metoda standard. De asemenea, o metodă standard se poate aplica referitor la criteriile de la punctul 5, cu excepția toxicității acvatice, care respectă condițiile menționate în anexa III

partea C, la Directiva 1999/45/CE. La preparatele reglementate de Directiva 91/414/CEE, se mai pot accepta date pentru clasificare și etichetare din alte metode recunoscute la nivel internațional (a se vedea dispozițiile speciale de la punctul 1.6 din prezenta anexă). În alte cazuri, evaluarea datelor disponibile trebuie să se facă prin compararea metodelor de testare utilizate cu cele indicate în anexa V și cu normele specificate în prezenta anexă pentru determinarea clasificării și etichetării adecvate.

Dacă pericolele pentru sănătate și mediul înconjurător se evaluează prin aplicarea unei metode standard, menționate în articolele 6 și 7 și anexele II și III la Directiva 1999/45/CE, concentrațiile limită individuale ce urmează să se utilizeze sunt cele stabilite, fie:

— în anexa I la prezenta directivă, fie

— în anexa II partea B și anexa III, partea B, la Directiva 1999/45/CE, dacă substanța sau substanțele nu apar în anexa I la prezenta directivă sau apar în aceasta fără concentrațiile limită.

În cazul preparatelor ce conțin amestecuri de gaze, clasificarea în ceea ce privește sănătatea și efectele asupra mediului înconjurător se stabilește prin metoda de calcul bazată pe concentrațiile limită individuale din anexa I la prezenta directivă, sau, dacă aceste limite nu există în anexa I, respectiva clasificare se realizează pe baza criteriilor din anexele II și III la Directiva 1999/45/CE.

1.7.3.1. *Preparate sau substanțe descrise la punctul 1.7.2.1, utilizate drept componente ale altor preparate*

Etichetarea acestor preparate trebuie să fie în conformitate cu dispozițiile din articolul 10 conform principiilor stabilite în articolele 3 și 4 din 1999/45/CE. Cu toate acestea, în anumite cazuri, datele privind eticheta preparatului sau substanței descris(e) la punctul 1.7.2.1 sunt insuficiente pentru a permite altor producători, care doresc să îl(o) utilizeze drept componentă a propriului (propriilor) preparat(e), să realizeze clasificarea și etichetarea corectă a preparatului (preparatelor) lor.

În cazurile menționate, persoana stabilită în Comunitate, responsabilă de introducerea pe piață a preparatului sau substanței descrise la punctul 1.7.2.1, fie că este producătorul, importatorul sau distribuitorul, depune o cerere justificată și prezintă cât se poate de repede toate datele necesare referitoare la substanțele periculoase pentru a permite clasificarea și etichetarea corectă a noului preparat. Datele respective mai sunt necesare și pentru a permite persoanei responsabile de introducerea pe piață a noului preparat să respecte alte condiții din Directiva 1999/45/CE.

2. CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE

2.1. **Introducere**

Metodele de testare referitoare la proprietățile explozive, oxidante și inflamabile incluse în anexa V servesc pentru a da un sens specific definițiilor generale prezentate în articolul 2 alineatul (2) literele (a)-(e). Criteriile rezultă direct din metodele de testare din anexa V în măsura în care sunt menționate.

Dacă există date adecvate care să demonstreze în practică faptul că proprietățile fizico-chimice ale substanțelor și preparatelor (în afară de peroxizii organici) sunt diferite de cele dovedite prin metodele de testare prezentate în anexa V, atunci aceste substanțe și preparate se clasifică conform pericolului pe care-l reprezintă, dacă există, pentru persoanele care manipulează substanțele și preparatele sau pentru alte persoane.

2.2. **Criteriile pentru clasificare, alegerea simbolurilor, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc**

Pentru preparate, este necesar să se ia în considerare criteriile menționate la articolul 5 din Directiva 1999/45/CE.

2.2.1. Exploziv

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca explozive și atribuirea simbolului „E” și a indicativului de pericol „exploziv” se fac în conformitate cu rezultatele testelor prezentate în anexa V și în măsura în care substanțele

și preparatele sunt explozive în forma în care sunt introduse pe piață. Este obligatorie o frază de risc și aceasta se specifică în funcție de următoarele criterii:

R2 Risc de explozie prin șoc, frecare, foc sau alte surse de incendiu

— Substanțele și preparatele, cu excepția celor stabilite în continuare.

R3 Risc ridicat de explozie prin șoc, frecare, foc sau alte surse de incendiu

— Substanțele și preparatele care sunt deosebit de sensibile, de exemplu, sărurile acidului picric sau PETN.

2.2.2. Oxidant

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca oxidante și atribuirea simbolului „O" și a indicativului de pericol „oxidant" se fac în conformitate cu rezultatele testărilor prezentate în anexa V. Este obligatorie o frază de risc și aceasta se va specifica în funcție de rezultatele testărilor, dar conform următoarelor criterii:

R7 Poate provoca incendiu

— Peroxizi organici care au proprietăți inflamabile chiar și atunci când nu sunt în contact cu alt material combustibil.

R8 Poate provoca incendiu în contact cu materiale combustibile

— Alte substanțe și preparate oxidante, inclusiv peroxizii anorganici, care pot să provoace foc sau să sporească riscul de foc atunci când vin în contact cu un material combustibil.

R9 Exploziv în amestec cu materiale combustibile

— Alte substanțe și preparate, inclusiv peroxizii anorganici, care devin explozive când sunt amestecate cu materiale combustibile, de exemplu, anumiți cloranți.

2.2.2.1. *Observații referitoare la peroxizi*

Pentru proprietățile explozive, un peroxid organic sau un preparat al acestuia, în forma în care se introduce pe piață, se clasifică în conformitate cu criteriile de la punctul 2.2.1 în funcție de testele realizate în conformitate cu metodele prezentate în anexa V.

Pentru proprietățile oxidante, metodele existente prezentate în anexa V nu se pot aplica peroxizilor organici.

Pentru substanțe, peroxizii organici care nu sunt clasificați deja ca explozivi se clasifică ca periculoși în funcție de structura acestora (de exemplu, R-O-O-H; R_1-O-O-R_2).

Preparatele care nu sunt deja clasificate ca explozive se clasifică cu ajutorul unei metode de calcul în funcție de procentul de oxigen activ, indicată la punctul 9.5.

Orice peroxid organic sau preparat al acestuia care nu este deja clasificat ca exploziv se clasifică ca oxidant, dacă peroxidul sau preparatul acestuia conțin

— mai mult decât 5 % peroxizi organici sau

— mai mult decât 0,5 % oxigen disponibil din peroxizii organici și mai mult decât 5 % perhidrol.

2.2.3. Foarte inflamabil

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca foarte inflamabile și atribuirea simbolului „F+" și indicativului de pericol „foarte inflamabil" se fac în conformitate cu rezultatele testărilor prezentate în anexa V. Fraza de risc se atribuie în conformitate cu următoarele criterii:

R12 Foarte inflamabil

— Substanțele și preparatele lichide care au o temperatură de aprindere sub 0 °C și o temperatură de fierbere (sau pentru un domeniu de fierbere temperatura inițială de fierbere) mai mică decât sau egală cu 35 °C.

— Substanțele și preparatele gazoase care se aprind în contact cu aerul la temperatura și presiunea ambiantă.

2.2.4. Ușor inflamabil

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca ușor inflamabile și atribuirea simbolului „F" și a indicativului de pericol „ușor inflamabil" se fac în conformitate cu rezultatele testărilor prezentate în anexa V. Frazele de risc se atribuie în conformitate cu următoarele criterii:

R11 Ușor inflamabil

— Substanțele și preparatele solide care se pot aprinde repede după contactul scurt cu o sursă de aprindere și care continuă să ardă sau să se consume după îndepărtarea sursei de aprindere.

— Substanțele și preparatele lichide care au o temperatură de aprindere sub 21 °C, dar care nu sunt extrem de inflamabile.

R15 Degajă gaze foarte inflamabile în contact cu apa

— Substanțele și preparatele care, în contact cu apa sau aerul umed, degajă gaze foarte inflamabile în cantități periculoase, la o rată minimă de 1 litru per kilogram per oră.

R17 Se aprinde spontan în contact cu aerul

— Substanțele și preparatele care pot să se înfierbânte și în final să se aprindă în contact cu aerul la temperatura ambiantă fără un aport de energie.

2.2.5. Inflamabil

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca inflamabile se face în conformitate cu rezultatele testărilor prezentate în anexa V. Fraza de risc se atribuie în conformitate cu criteriile prezentate în continuare:

R10 Inflamabil

— Substanțele și preparatele lichide care au o temperatură de aprindere egală cu sau mai mare decât 21 °C și mai mică decât sau egală cu 55 °C.

Cu toate acestea, în practică s-a arătat că un preparat care are o temperatură de aprindere egală cu sau mai mare decât 21 °C și mai mică decât sau egală cu 55 °C nu este nevoie să se clasifice ca inflamabilă, dacă preparatul nu poate în nici un fel să întrețină arderea și numai atâta timp cât cei care manipulează preparatele respective sau alte persoane nu au motive să se teamă de riscuri.

2.2.6. Alte proprietăți fizico-chimice

Se atribuie fraze suplimentare de risc substanțelor și preparatelor care au fost clasificate în temeiul punctelor. 2.2.1-2.2.5 sau a punctelor 3, 4 și 5, în conformitate cu criteriile enumerate în continuare (pe baza experienței obținute în timpul redactării Anexei I):

R1 Exploziv în mediu uscat

Pentru substanțele și preparatele explozive introduse pe piață în soluție sau într-o formă umedă, de exemplu nitroceluloză cu un conținut de azot mai mare de 12,6 %.

R4 Formează compuși metalici explozivi foarte sensibili

Pentru substanțele și preparatele care pot să formeze derivați metalici explozivi sensibili, de exemplu acid picric, acid stifnic.

R5 Poate provoca explozie sub acțiunea căldurii

Pentru substanțele și preparatele instabile termic care nu se clasifică drept explozive, de exemplu acid percloric > 50 %.

R6 Explozive în contact sau fără contact cu aerul

Pentru substanțele și preparatele care sunt instabile la temperatura ambiantă, de exemplu acetilena.

R7 Poate provoca incendiu

Pentru substanțele și preparatele reactive, de exemplu fluorul, hidrosulfit de sodiu.

R14 Reacționează violent în contact cu apa

Pentru substanțele și preparatele care reacționează violent cu apa, de exemplu, clorura de acetil, metalele alcaline, tetraclorura de titan.

R16 Exploziv în amestec cu substanțe oxidante

Pentru substanțele și preparatele care reacționează exploziv cu un agent oxidant, de exemplu, fosforul roșu.

R18 Poate forma amestec de vapori-aer inflamabili/explozivi în timpul utilizării

Pentru preparatele care nu se clasifică de fapt ca inflamabile, care conțin componente volatile care sunt inflamabile în aer.

R19 Poate forma peroxizi explozivi

Pentru substanțele și preparatele care pot să formeze peroxizi explozivi în timpul depozitării, de exemplu, dietil eter, 1,4-dioxan.

R30 Poate deveni ușor inflamabil în timpul utilizării

Pentru preparatele care nu se clasifică de fapt ca inflamabile, care pot să devină inflamabile datorită pierderii componentelor volatile neinflamabile.

R44 Risc de explozie prin încălzire în mediu închis

Pentru substanțele și preparatele care nu se clasifică de fapt ca explozive în conformitate cu punctul 2.2.1 anterior, dar care, în practică, pot totuși să prezinte proprietăți explozive, dacă sunt încălzite într-un spațiu suficient de închis. De exemplu, anumite substanțe care ar putea să se descompună cu explozie, dacă sunt încălzite într-un bidon din oțel, nu prezintă efectul menționat dacă sunt încălzite în recipiente mai puțin rezistente.

Pentru alte fraze de risc suplimentare, a se vedea punctul 3.2.8.

3. CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE PROPRIETĂȚILE TOXICOLOGICE

3.1. **Introducere**

3.1.1. Clasificarea implică atât efectele acute cât și cele pe termen lung ale substanțelor și preparatelor, fie că rezultă dintr-o singură expunere, fie dintr-o expunere prelungită sau repetată.

Dacă se poate demonstra prin studii epidemiologice, prin studii de caz valabile din punct de vedere științific conform specificațiilor din prezenta anexă sau printr-o experiență fundamentată statistic, ca evaluarea datelor de la unitățile de informații toxicologice sau a celor referitoare la bolile profesionale, că efectele toxicologice asupra omului diferă de cele sugerate prin aplicarea metodelor specificate la punctul 1.6 din prezenta anexă, atunci substanța sau preparatul se clasifică în conformitate cu efectele sale asupra omului. Cu toate acestea, testele pe om trebuie să fie descurajate și, în mod normal, nu trebuie utilizate pentru a respinge datele pozitive pe animale.

Directiva 86/609/CEE caută să protejeze animalele utilizate pentru scopuri experimentale și altele științifice. Pentru câteva cazuri extreme există metode de testare *in vitro* în anexa V la prezenta directivă și testele respective se utilizează, dacă este cazul.

3.1.2. Clasificarea substanțelor se face în funcție de datele experimentale disponibile în conformitate cu criteriile prezentate în continuare, care țin seama de amploarea efectelor respective:

(a) pentru toxicitatea acută (efecte letale și ireversibile după o singură expunere), urmează să se utilizeze criteriile de la punctele 3.2.1-3.2.3;

(b) pentru toxicitatea subacută, subcronică sau cronică, urmează să se utilizeze criteriile de la punctele 3.2.2-3.2.4;

(c) pentru efectele corosive și iritante, urmează să se utilizeze criteriile de la punctele 3.2.5-3.2.6;

(d) pentru efectele de sensibilizare, urmează să se utilizeze criteriile de la punctul 3.2.7;

(e) pentru efectele specifice asupra sănătății (cu caracter cancerigen, mutagen, și toxicitate asupra reproducerii), urmează să se utilizeze criteriile de la punctul 4.

3.1.3. Pentru preparate, clasificarea referitoare la pericolul pentru sănătate se realizează:

(a) pe baza metodei standard menționată în articolul 6 din și în anexa II la Directiva 1999/45/CE în absența datelor experimentale. În acest caz, clasificarea se face în funcție de concentrațiile limită individuale:

— luate fie din anexa I la prezenta directivă, fie

— din anexa II partea B, la Directiva 1999/45/CE, dacă substanța sau substanțele nu apar în anexa I la prezenta directivă sau apar în aceasta fără concentrațiile limită;

(b) sau, când sunt disponibile date experimentale, conform criteriilor descrise la punctul 3.1.2, excluzând proprietățile cancerigene, mutagene sau toxice pentru reproducere menționate la punctul 3.1.2 litera (e) care trebuie să se evalueze printr-o metodă standard menționată la articolul 6 din sau în anexa II părțile A.7-9 și B.6, la Directiva 1999/45/CE.

Notă: Fără a aduce atingere dispozițiilor din Directiva 91/414/CEE, numai dacă persoanele responsabile de introducerea preparatului pe piață pot să demonstreze științific că proprietățile toxicologice ale preparatului nu se pot determina în mod corect prin metoda prezentată la punctul 3.1.3 litera (a) sau pe baza rezultatelor existente ale testelor pe animale, se pot utiliza metodele prezentate la punctul 3.1.3 litera (b), cu condiția ca acestea să fie justificate sau autorizate în mod special conform articolului 12 din Directiva 86/609/CEE.

Oricare este metoda utilizată pentru evaluarea pericolului unui preparat, trebuie să se ia în considerare toate efectele periculoase asupra sănătății conform criteriilor din anexa II, partea B, la Directiva 1999/45/CE.

3.1.4. Când clasificarea urmează să se stabilească din rezultatele experimentale obținute în testele pe animale, rezultatele trebuie să fie valabile pentru om, prin aceea că testele reflectă într-un mod corespunzător, riscurile pentru om.

3.1.5. Toxicitatea orală acută a substanțelor sau preparatelor introduse pe piață se poate stabili fie printr-o metodă care să permită determinarea valorii DL_{50}, fie prin determinarea dozei caracteristice (metoda dozei fixe), fie prin determinarea domeniului de expunere în care se estimează letalitatea (metoda clasei de toxicitate acută).

3.1.5.1. Doza caracteristică este doza care provoacă o toxicitate evidentă, dar nu mortalitatea și trebuie să reprezinte unul dintre cele patru nivele ale dozajului specificate în anexa V (5, 50, 500 sau 2 000 mg per kg de greutate a corpului).

Noțiunea de „toxicitate evidentă” se utilizează pentru a desemna efectele toxice, după expunere la substanța testată, care sunt atât de severe, încât expunerea la următoarea doză fixă mai mare ar conduce probabil la mortalitate.

Rezultatele testului la o anumită doză, conform metodei cu doză fixă pot să fie:

— supraviețuire mai puțin de 100 %;

— supraviețuire 100 %, dar toxicitate evidentă;

— supraviețuire 100 %, dar fără toxicitate evidentă.

În criteriile de la punctele 3.2.1, 3.2.2 și 3.2.3, se prezintă numai rezultatul testului final. Se recomandă să se utilizeze în principal doza de 2 000 mg/kg în primul rând pentru a obține informații privind efectele toxice ale substanțelor care au o toxicitate acută mică și care nu sunt clasificate în funcție de toxicitatea acută.

În unele cazuri, metoda dozei fixe necesită efectuarea testului la doze mai mari sau mai mici, dacă acesta nu s-a efectuat deja la nivelul dozei relevante. Se face trimitere și la tabelul de evaluare din metoda de testare B.1 *bis*.

3.1.5.2. Domeniul de expunere în care se estimează letalitatea se obține din observarea absenței sau prezenței mortalității datorate substanței conform metodei pentru clasa de toxicitate acută. Pentru testul inițial se utilizează una din cele trei doze inițiale fixe (25, 200 sau 2 000 mg per kg greutatea corpului).

Metoda pentru clasa de toxicitate acută necesită în unele cazuri efectuarea testului la doze mai mari sau mai mici, dacă acesta nu s-a făcut la nivelul dozei relevante. De asemenea, se face trimitere la diagramele cu protocolul testului din metoda de testare B.1 *ter* din anexa V.

3.2. **Criteriile pentru clasificare, alegerea simbolurilor, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc**

3.2.1. Foarte toxic

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca foarte toxice și atribuirea simbolului „T+" și a indicativului de pericol „foarte toxic" se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare.

Frazele de risc se atribuie în conformitate cu următoarele criterii:

R28 Foarte toxic în cazul ingestiei

Rezultatele toxicității acute:

— DL_{50} oral, șobolan: ≤ 25 mg/kg,

— supraviețuire mai puțin de 100 % la 5 mg/kg oral, șobolan prin metoda dozei fixe sau

— mortalitate mare la doze ≤ 25 mg/kg oral, șobolan prin metoda clasei de toxicitate acută (pentru interpretarea rezultatelor testului, a se vedea diagramele protocolului din apendicele 2 la metoda de testare B.1 *ter* din anexa V).

R27 Foarte toxic în contact cu pielea

Rezultatele toxicității acute:

— DL_{50} dermic, șobolan sau iepure: ≤ 50 mg/kg.

R26 Foarte toxic în cazul inhalării

Rezultatele toxicității acute:

— CL_{50} inhalare, șobolan, pentru aerosoli sau macroparticule: ≤ 0,25 mg/litru/4 h,

— CL_{50} inhalare, șobolan, pentru gaze și vapori: ≤ 0,5 mg/litru/4 h

R39

Pericol de efecte foarte grave ireversibile

— Dovadă puternică a unei posibile leziuni ireversibile, alta decât efectele menționate la punctul 4, la o singură expunere pe o cale potrivită, în general în domeniul de doze menționate anterior.

Pentru a arăta calea de administrare/expunere, se utilizează una din următoarele combinații: R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/26/28, R39/27/28, R39/26/27/28.

3.2.2. Toxic

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca toxice și atribuirea simbolului „T" și a indicativului de pericol „toxic" se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare. Frazele de risc se atribuie în conformitate cu următoarele criterii:

R25 Toxic în cazul ingestiei

Rezultatele toxicității acute:

— DL_{50} oral, șobolan: $25 < DL_{50} \leq 200$ mg/kg,

— doza caracteristică, oral, șobolan, 5 mg/kg: supraviețuire 100 %, dar toxicitate evidentă sau

— mortalitate mare în domeniul de >25-≤ 200 mg/kg oral, șobolan prin metoda clasei de toxicitate acută (pentru interpretarea rezultatelor testului, a se vedea diagramele protocolului din apendicele 2 la metoda de testare B.1 *ter* din anexa V).

R24 Toxic în contact cu pielea

Rezultatele toxicității acute:

— DL_{50} dermic, șobolan sau iepure: $50 < DL_{50} \leq 400$ mg/kg.

R23 Toxic în cazul inhalării

Rezultatele toxicității acute:

— CL_{50} inhalare, șobolan, pentru aerosoli sau macroparticule: $0,25 < CL_{50} \leq 1$ mg /litru/4 h,

— CL_{50} inhalare, șobolan, pentru gaze și vapori: $0,5 < CL_{50} \leq 2$ mg/litru/4 h.

R39

Pericol de efecte foarte grave ireversibile

— Dovadă puternică a unei posibile leziuni, alta decât efectele menționate la punctul 4, la o singură expunere pe o cale potrivită, în general în domeniul de doze menționate anterior.

Pentru a arăta calea de administrare/expunere, se utilizează una din următoarele combinații: R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R29/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

R48

Risc de efecte grave asupra sănătății în caz de expunere prelungită

— este posibilă o deteriorare severă (perturbare clară a funcțiilor sau modificare morfologică de importanță toxicologică) la o expunere repetată sau prelungită pe o cale potrivită.

Substanțele și preparatele se clasifică cel puțin ca toxice când atunci când efectele menționate se observă la nivele cu un ordin de mărime mai mic (de exemplu, de 10 ori) decât cele stabilite pentru R48 la punctul 3.2.3.

Pentru a arăta calea de administrare/expunere, se utilizează una din următoarele combinații: R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/23/25, R48/24/25, R48/23/24/25.

3.2.3. Nociv

Clasificarea substanțelor și preparatelor ca nocive și atribuirea simbolului „Xn” și a indicativului de pericol „nociv” se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare. Frazele de risc se atribuie în conformitate cu următoarele criterii:

R22 Nociv în cazul ingestiei

Rezultatele toxicității acute:

— DL_{50} per oral, șobolan: $200 < DL_{50} \leq 2\,000$ mg/kg,

— doza caracteristică, oral, șobolan, 50 mg/kg: supraviețuire 100 %, dar toxicitate evidentă,

— supraviețuire mai puțin de 100 % la 500 mg/kg, șobolan, oral prin metoda dozei fixe. Se face trimitere la tabelul de evaluare de la metoda de testare B.1 *bis* din anexa V sau

— mortalitate mare în domeniul de doze >200 - ≤ 2 000 mg/kg oral, șobolan prin metoda clasei de toxicitate acută (pentru interpretarea rezultatelor testului, a se vedea diagramele protocolului din apendicele 2 la metoda de testare B.1 *ter* din anexa V).

R21 Nociv în contact cu pielea

Rezultatele toxicității acute:

— DL_{50} dermic, șobolan sau iepure: $400 < DL_{50} \leq 2\,000$ mg/kg.

R20 Nociv în cazul inhalării

Rezultatele toxicității acute:

— CL_{50} inhalare, șobolan, pentru aerosoli sau macroparticule: $1 < CL_{50} \leq 5$ mg /litru/4 h,

— CL_{50} inhalare, șobolan, pentru gaze și vapori: $2 < CL_{50} \leq 20$ mg/litru/4 h.

R65 Nociv: Poate fi nociv pentru plămâni în cazul ingestiei

Substanțele și preparatele lichide care prezintă pericol de aspirare la oameni datorită vâscozității mici a acestora:

(a) pentru substanțele și preparatele ce conțin hidrocarburi alifatice, aciclice și aromatice în concentrație totală egală cu sau mai mare de 10 % și care au, fie

— un timp de curgere mai mic de 30 de secunde printr-o cupă ISO de 3 mm conform ISO 2431 (ediția aprilie 1996/iulie 1999) referitor la „Lacuri și vopsele - determinarea timpului de curgere cu ajutorul cupelor de curgere”, fie

— o vâscozitate cinematică, măsurată cu un viscozimetru cu capilară calibrată din sticlă în conformitate cu ISO 3104/3105, mai mică de 7×10^{-6} m^2/sec, la 40 °C (ISO 3104, ediția 1994, referitor la „Produse petroliere – Lichide transparente și opace - Determinarea vâscozității cinematice și calculul vâscozității dinamice”; ISO 3105, ediția 1994, referitor la „Viscozimetru cinematic cu capilară din sticlă – Specificații și instrucțiuni de lucru”), fie

— o vâscozitate cinematică, obținută din măsurătorile cu viscozimetru rotativ în conformitate cu ISO 3219, mai mică de 7×10^{-6} m^2/sec, la 40 °C (ISO 3219, ediția 1993, referitor la „Materiale plastice – Polimeri/rășini în stare lichidă sau sub formă de emulsii sau dispersii – Determinarea vâscozității cu ajutorul unui viscozimetru rotativ cu o viteză de forfecare specificată”).

A observa că nu este necesar ca substanțele și preparatele care îndeplinesc criteriile menționate anterior să se clasifice, dacă au o tensiune superficială medie mai mare de 33 mN/m la 25 °C, măsurată cu tensiometru Nouy sau prin metodele de testare prezentate în anexa V, partea A.5;

(b) pentru substanțe și preparate, pe baza experienței practice la oameni.

R68 Posibil risc de efecte ireversibile

— Dovadă puternică a unei posibile leziuni, alta decât efectele menționate la punctul 4, la o singură expunere pe o cale potrivită, în general în domeniul de doze menționate anterior.

Pentru a arăta calea de administrare/expunere, se utilizează una din următoarele combinații: R68/20, R68/21, R68/22, R68/20/21, R68/20/22, R68/21/22, R68/20/21/22.

R48 Risc de efecte grave asupra sănătății în caz de expunere prelungită

— este posibilă o deteriorare severă (perturbare clară a funcțiilor sau modificare morfologică de importanță toxicologică) la o expunere repetată sau prelungită pe o cale potrivită.

Substanțele și preparatele se clasifică cel puțin ca nocive atunci când efectele menționate se observă la nivele de ordinul a:

— oral, șobolan ≤ 50 mg/kg (greutatea corpului)/zi;

— dermic, șobolan sau iepure ≤ 100 mg/kg (greutatea corpului)/zi;

— inhalare, șobolan ≤ 0,25 mg/l, 6 h/zi.

Valorile orientative menționate se pot aplica direct atunci când se observă leziuni severe într-un test de toxicitate subcronică (90 de zile). La interpretarea rezultatelor unui test de toxicitate subacută (28 de zile), este necesar ca cifrele prezentate să se amplifice de aproximativ trei ori. Dacă este disponibil un test de toxicitate cronică (doi ani), evaluarea rezultatelor se face de la caz la caz. Dacă sunt disponibile rezultatele unor studii cu durată mai mare de un an, se utilizează, de obicei, cele din studiul cu durata cea mai mare.

Pentru a arăta calea de administrare/expunere, se utilizează una din următoarele combinații: R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

3.2.3.1. *Explicații privind substanțele volatile*

Pentru anumite substanțe cu o concentrație mare a vaporilor saturați, pot exista dovezi care să indice efecte care produc îngrijorare. Aceste substanțe pot să nu fie clasificate conform criteriilor pentru efecte asupra sănătății din prezentul ghid (3.2.3), sau pot să nu facă obiectul punctului 3.2.8. Cu toate acestea, dacă există dovezi corespunzătoare că aceste substanțe pot să prezinte un risc în timpul manipulării și utilizării normale, atunci poate fi necesară clasificarea de la caz la caz din anexa I.

3.2.4. Observații privind utilizarea R48

Utilizarea frazei de risc se referă la domeniul specific al efectelor biologice în termenii descriși în continuare. Pentru aplicarea frazei de risc, trebuie să se aibă în vedere o deteriorare serioasă a sănătății care să includă decesul, perturbarea clară a funcțiilor sau modificări morfologice care sunt importante din punct de vedere toxicologic. Este deosebit de importantă când modificările menționate sunt ireversibile. De asemenea, este

important să se țină seama nu numai de modificările severe specifice dintr-un singur organ sau sistem biologic, ci și de modificările generalizate mai puțin severe care includ câteva organe sau modificările severe ale stării de sănătate în general.

Pentru a evalua dacă există dovezi pentru tipurile de efecte menționate, trebuie să se țină seama de următoarele linii directoare:

1. Dovezile că este necesară aplicarea R48:

   (a) decese datorate substanței;

   (b) (i) modificări funcționale importante în sistemul nervos central sau periferic, care include vederea, auzul și simțul mirosului, evaluate prin observații clinice sau alte metode potrivite (de exemplu, electrofiziologie);

   (ii) modificări funcționale majore în alte sisteme de organe (de exemplu, plămânul);

   (b) orice modificări consistente ale parametrilor de biochimie clinică, hematologie sau examen de urină care indică disfuncții severe ale organelor. Se consideră că anomaliile hematologice sunt deosebit de importante, dacă dovezile sugerează că acestea se datorează unei producții scăzute de celule ale sângelui din măduva osoasă;

   (c) lezare severă a organelor observată la examinarea microscopică în urma autopsiei:

   (i) necroză, fibroză întinse sau severe sau formarea de granuloame în organele vitale cu capacitate regenerativă (de exemplu, ficat);

   (ii) modificări morfologice severe care pot fi reversibile, dar sunt o dovadă clară a disfuncției pronunțate a organului (de exemplu, modificări severe ale lipidelor în ficat, nefroză tubulară acută severă în rinichi, gastrită ulceroasă) sau

   (iii) dovada unei morți apreciabile a celulelor din organele vitale incapabile de regenerare (de exemplu, fibroza miocardului sau partea dorsală muribundă a unui nerv) sau din populațiile de hematocitoblaști (de exemplu, aplazia sau hipoplazia măduvei osoase).

   Dovezile menționate anterior se vor obține de obicei din experimentări pe animale. Dacă se iau în considerare datele rezultate din experiența practică, este necesar să se acorde o atenție specială nivelelor de expunere.

2. Dovezile că nu este necesară aplicarea R48:

   Utilizarea frazei de risc menționate se restrânge la „deteriorarea serioasă a sănătății la expunere prelungită”. Se pot observa o serie de efecte aferente substanței atât la oameni cât și la animale, care nu ar justifica utilizarea R48. Efectele respective sunt relevante atunci când se încearcă să se determine un nivel fără efecte pentru o substanță chimică.

   Exemple de modificări bine documentate care, în mod normal, nu ar justifica clasificarea cu R48, indiferent de importanța statistică a acestora, includ:

   (a) observații clinice sau modificări ale creșterii greutății corporale, consumului de alimente sau apei băute, care pot avea importanță toxicologică, dar care nu indică, ele însele, o „deteriorare serioasă”;

   (b) mici modificări ale parametrilor de biochimie clinică, hematologie sau examen al urinei, care sunt de o îndoielnică sau minimă importanță toxicologică;

   (c) modificări ale greutăților organelor fără semne de disfuncție a organelor;

   (d) răspunsuri de adaptare (de exemplu, migrarea macrofagilor în plămâni, hipertrofia ficatului și inducția enzimatică, răspunsuri hiperplastice la iritanți). Efectele locale asupra pielii produse prin aplicarea dermică repetată a unei substanțe căreia i se potrivește mai bine R38 „iritant pentru piele” sau

   (e) dacă a fost demonstrat un mecanism de toxicitate specific speciei (de exemplu, căi metabolice specifice).

3.2.5. Corosiv

Clasificarea substanțelor sau preparatelor drept corosive și atribuirea simbolului „C” și a indicativului de pericol „corosiv” se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare.

— o substanță sau un preparat se consideră ca fiind corosiv dacă, atunci când se aplică pe pielea intactă a unui animal sănătos, produce o distrugere în toată grosimea a țesutului pielii la cel puțin un animal în timpul testului de iritare a pielii menționat în anexa V sau în timpul unei metode echivalente;

— clasificarea se poate face în funcție de rezultatele unui test *in vitro* validat, ca acela menționat la anexa V (B.40. Coroziunea pielii: determinarea rezistenței electrice transcutanate în pielea de șobolan și determinarea modelului de piele umană);

— de asemenea, o substanță sau un preparat se consideră corosiv, dacă rezultatul se poate preconiza, de exemplu, din reacțiile puternic acide sau alcaline indicate de un pH egal cu 2 sau mai mic sau de 11,5 sau mai mare. Cu toate acestea, dacă clasificarea s-a făcut pe baza unui pH extrem, se poate lua în considerare și rezerva acid/bază [1]. Dacă luarea în considerare a rezervei de acid/bază sugerează că substanța sau preparatul nu poate să fie corosiv(ă), atunci trebuie să se efectueze alte testări pentru a confirma acest lucru, de preferință prin utilizarea unui test corespunzător *in vitro* validat. Luarea în considerare a rezervei acid/bază nu se utilizează singură pentru a scuti substanțele sau preparatele de a fi clasificate drept corosive.

Frazele de risc se atribuie în conformitate cu criteriile prezentate în continuare:

R35 Provoacă arsuri grave

— dacă, atunci când se aplică pe pielea intactă a animalelor sănătoase, are loc distrugerea în toată grosimea a țesutului pielii în urma expunerii de până la trei minute sau dacă rezultatul respectiv se poate preconiza.

R34 Provoacă arsuri

— dacă, atunci când se aplică pe pielea intactă a animalului sănătos, are loc distrugerea în toată grosimea a țesutului pielii în urma unei expuneri de până la patru ore sau dacă rezultatul respectiv se poate preconiza;

— hidroperoxizi organici, cu excepția cazului în care există dovezi ale contrariului.

Note:

Dacă clasificarea se face în funcție de rezultatele unui test *in vitro* validat, R35 sau R34 se aplică în funcție de capacitatea metodei de testare de a face deosebirea între acestea.

Dacă la clasificare se ia în considerare doar pH-ul extrem, se aplică R35.

3.2.6. Iritant

Clasificarea substanțelor sau preparatelor drept iritante și atribuirea simbolului „Xi” și a indicativului de pericol „iritant” se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare.

3.2.6.1. *Inflamarea pielii*

Frazele de risc se atribuie în conformitate cu criteriile prezentate în continuare:

R38 Iritant pentru piele

— Substanțele și preparatele care provoacă o inflamare importantă a pielii, care persistă cel puțin 24 ore după o perioadă de expunere de până la patru ore, determinată la iepure, conform metodei de testare a iritației cutanate specificate în anexa V.

Inflamarea pielii este semnificativă, dacă:

(a) valoarea medie a semnelor pentru formarea oricărui eritem și escare sau formarea edemului, calculată pentru toate animalele testate, este 2 sau mai mare sau

(b) pentru cazul în care testul din anexa V a fost definitivat pe trei animale, s-a observat, la două sau mai multe animale, fie formarea unui eritem și escare, fie formarea unei edeme, echivalente cu o valoare medie de 2 sau mai mare, calculată pentru fiecare animal în parte.

În ambele cazuri, este necesar să se utilizeze toate semnele, observate la fiecare din timpii de citire (24, 48 și 72 de ore) pentru un efect, pentru calcularea valorilor medii respective.

Inflamarea pielii mai este semnificativă dacă persistă la cel puțin două animale la sfârșitul timpului de observare. Trebuie să se țină seama de efectele speciale, de exemplu hiperplazie, descuamare, decolorare, fisuri, cruste și alopecie.

[1] J. R.Young, M. J. How, A.P.Walker și W.M.H.Worth (1988), „Clasificarea drept corosive sau iritante pentru piele a preparatelor ce conțin substanțe acide sau alcaline, fără testare pe animale”, *Toxic. In Vitro* 2(1), pp. 19-26.

Se mai pot obține date relevante din studiile neacute pe animale (a se vedea explicațiile pentru R48, punctul 2.d). Datele respective se consideră semnificative, dacă efectele observate sunt comparabile cu cele descrise anterior.

— Substanțele și preparatele care provoacă o inflamare importantă a pielii, din observațiile practice pe oameni la contactul imediat, prelungit sau repetat.

— Peroxizii organici, cu excepția cazului în care există dovezi ale contrariului.

Parestezie

Parestezia provocată la oameni prin contactul pielii cu pesticidele piretroide nu se consideră un efect iritant care să justifice clasificarea ca Xi; R38. Cu toate acestea, este necesar să se aplice fraza S, și anume S24, pentru substanțele la care se observă că produc efectul respectiv.

3.2.6.2. *Leziuni oculare*

Se atribuie frazele de risc în conformitate cu criteriile prezentate în continuare:

R36 Iritant pentru ochi

— Substanțele și preparatele care, atunci când sunt aplicate pe ochiul animalului, provoacă leziuni oculare importante care se produc în termen de 72 de ore de la expunere și care persistă cel puțin 24 de ore.

Leziunile oculare sunt importante, dacă semnele medii ale testului de iritare a ochiului specificate în anexa V au oricare din următoarele valori:

— opacitatea corneei este egală cu sau mai mare de 2, dar mai mică de 3;

— leziunea irisului este egală cu sau mai mare de 1, dar nu mai mare de 1,5;

— roșeața conjunctivei este egală cu sau mai mare de 2,5;

— edemul conjunctivei (chemozis) este egală cu sau mai mare de 2,

sau, pentru cazul în care testul din anexa V a fost definitivat pe trei animale, dacă leziunile, pe două sau mai multe animale, au oricare din valorile menționate anterior, cu excepția valorii pentru leziunea irisului care trebuie să fie egală sau mai mare de 1, dar mai mică decât 2 și pentru roșeața conjunctivei, valoarea trebuie să fie egală cu sau mai mare de 2,5.

În ambele cazuri, se utilizează toate semnele, la fiecare din timpii de citire (24, 48 și 72 de ore) pentru un efect, pentru calculul valorilor medii respective.

— Substanțele și preparatele care provoacă leziuni oculare importante, constatate în experiențele pe oameni.

— Peroxizii organici, cu excepția cazului în care nu există dovezi ale contrariului.

R41 Risc de leziuni oculare grave

— Substanțele și preparatele care, atunci când sunt aplicate pe ochiul animalului provoacă leziuni oculare severe care se produc în termen de 72 de ore de la expunere și care persistă cel puțin 24 de ore.

Leziunile oculare sunt severe, dacă mediile semnelor din testul de iritare a ochiului din anexa V au oricare din valorile:

— opacitatea corneei egală sau mai mare de 3;

— leziunea irisului mai mare de 1,5.

Același lucru este valabil pentru cazul în care testul a fost definitivat pe trei animale, dacă leziunile menționate, le două sau mai multe animale, au oricare din valorile:

— opacitatea corneei egală sau mai mare de 3;

— leziunea irisului egală cu 2.

În ambele cazuri, se utilizează toate semnele, la fiecare din timpii de citire (24, 48 și 72 de ore) pentru un efect, pentru calculul valorilor medii respective.

De asemenea, leziunile oculare sunt severe atunci când mai sunt prezente la sfârșitul timpului de observare.

De asemenea, leziunile oculare sunt severe, dacă substanța sau preparatul provoacă o colorare ireversibilă a ochilor.

— Substanțele și preparatele care provoacă leziuni oculare severe, observate în experiența practică la oameni.

Notă:

Atunci când o substanță sau un preparat se clasifică drept corosiv și i se atribuie R34 sau R35, riscul vătămării severe a ochiului se ia în considerare implicit și R41 nu se include în etichetă.

3.2.6.3. *Iritarea sistemului respirator*

Se atribuie următoarele fraze de risc în conformitate cu criteriile prezentate în continuare:

R37 Iritant pentru aparatul respirator

Substanțele și preparatele care provoacă o iritare serioasă a sistemului respirator, pe baza:

— observațiilor practice la oameni;

— rezultatelor pozitive din testele corespunzătoare pe animale.

Explicații referitoare la utilizarea R37:

În interpretarea observațiilor practice la oameni, trebuie să se aibă grijă pentru a face distincție între efectele care conduc la clasificarea cu R48 (a se vedea punctul 3.2.4) și cele care conduc la clasificarea cu R37. Condițiile care conduc în mod normal la clasificarea cu R37 sunt reversibile și, de obicei, limitate la căile respiratorii superioare.

Rezultatele pozitive ale testelor corespunzătoare pe animale pot să includă datele obținute într-un test de toxicitate generală, care include date histopatologice din sistemul respirator. Se pot folosi și datele de la măsurarea bradipneei experimentale pentru evaluarea iritației căilor respiratorii.

3.2.7. Sensibilizare

3.2.7.1. *Sensibilizarea prin inhalare*

Clasificarea substanțelor sau preparatelor drept sensibilizatoare și atribuirea simbolului „Xn”, a indicativului de pericol „nociv” și a frazei de risc R42 se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare.

R42 Poate provoca sensibilizare prin inhalare

— dacă există dovezi că substanța sau preparatul pot să inducă hipersensibilitate respiratorie specifică;

— dacă există rezultate pozitive din testele corespunzătoare pe animale sau

— dacă substanța este un izocianat, cu excepția cazului în care există dovezi că izocianatul specific nu provoacă hipersensibilitate respiratorie.

Explicații referitoare la utilizarea R42:

Dovezi la oameni

Dovezi că substanța sau preparatul pot să inducă o hipersensibilitate respiratorie specifică se bazează în mod normal pe experiența la oameni. În contextul respectiv, hipersensibilitatea este considerată în mod normal drept astm, dar se pot lua în considerare și alte reacții de hipersensibilitate, ca rinita și alveolita. Condiția are caracterul clinic al unei reacții alergice. Cu toate acestea, mecanismele imunologice nu trebuie să fie demonstrate.

Când se iau în considerare dovezile de la expunerea oamenilor, este necesar să se țină seama de o decizie privind clasificarea, în afară de dovezile din cazurile:

— numărul populației expuse,

— gradul de expunere.

Dovezile menționate anterior pot să fie:

— foaia de observație clinică și datele din testele corespunzătoare pentru funcția plămânilor referitoare la expunerea la substanță, confirmate de alte dovezi susținătoare care pot să includă:

  — o structură chimică referitoare la substanțele cunoscute că provoacă hipersensibilitate respiratorie;

  — un test imunologic *in vivo* (de exemplu, test de înțepare a pielii);

  — un test imunologic *in vitro* (de exemplu, analiza serologică);

  — studii care să indice alte mecanisme specifice, dar neimunologice de acțiune, de exemplu iritarea redusă repetată, efectele mijlocite farmacologic sau

  — datele de la un test de semiotică bronșică pozitivă cu substanța, condus conform liniilor directoare acceptate pentru determinarea unei reacții specifice de hipersensibilitate.

Foaia de observație clinică trebuie să includă atât fișa medicală, cât și anamneza profesională, pentru a determina o relație între expunerea la o anumită substanță sau anumit preparat și dezvoltarea hipersensibilității respiratorii. Datele relevante includ factorii agravanți atât de acasă, cât și de la locul de muncă, debutul și evoluția bolii, anamneza familială și fișa medicală a pacientului în discuție. Fișa medicală ar mai trebui să includă o notă cu privire la alte tulburări alergice sau ale căilor respiratorii din copilărie și anamneza fumatului.

Se consideră că rezultatele de la testele de semiotică bronșică pozitivă oferă dovezi suficiente pentru clasificarea prin ele însele. Se recunoaște totuși că, în practică, multe din examinările menționate anterior vor fi fost deja efectuate.

Substanțelor care provoacă simptoame de astm prin iritare doar la oamenii cu hiperreactivitate bronșică nu li se atribuie R42.

Studii pe animale

Datele din testele care pot să indice potențialul unei substanțe sau preparat de a provoca sensibilizarea prin inhalare la oameni pot să includă:

— măsurători de IgE (de exemplu, la șoareci) sau

— răspunsuri pulmonare specifice la cobai.

3.2.7.2. *Sensibilizarea prin contact cu pielea*

Clasificarea substanțelor sau preparatelor drept sensibilizatoare și atribuirea simbolului „Xi", a indicativului de pericol „iritant" și a frazei de risc R43 se fac în conformitate cu criteriile specificate în continuare.

R43 Pot să provoace sensibilizarea prin contact cu pielea

— dacă experiența practică arată că substanța sau preparatul pot să inducă o sensibilizare prin contactul cu pielea la un număr însemnat de persoane sau

— dacă există rezultate pozitive de la un test corespunzător pe animale.

Explicații referitoare la utilizarea R43:

Dovezi la oameni

Dovezile următoare (experiența practică) sunt suficiente pentru clasificarea unei substanțe sau preparat cu R43:

— datele pozitive de la un test corespunzător de scarificare, efectuat în mod normal în mai multe clinici dermatologice sau

— studiile epidemiologice care să indice dermatitele alergice de contact provocate de substanță sau preparat. Situațiile în care o proporție ridicată din cei expuși prezintă simptoame caracteristice urmează să fie privite cu o atenție deosebită, chiar dacă numărul cazurilor este mic sau

— datele pozitive din studiile experimentale la oameni (a se vedea și 3.1.1).

Cele prezentate în continuare sunt suficiente pentru a clasifica o substanță cu R43 când există dovezi susținătoare:

— accese izolate de dermatite alergice de contact sau

— studii epidemiologice în care întâmplarea, înclinația sau confuziile nu au fost eliminate în totalitate cu certitudine.

Dovezile susținătoare pot să includă:

— date de la testele pe animale efectuate conform liniilor directoare existente, cu un rezultat care nu satisface criteriile prezentate la punctul privind studiile pe animale, dar sunt suficient de apropiate de limită pentru a fi considerate importante sau

— datele de la metodele nestandard sau

— relațiile structură-activitate corespunzătoare.

Studiile pe animale

Rezultatele pozitive de la studiile corespunzătoare pe animale sunt:

— pentru metoda de testare de tip adjuvant pentru sensibilizarea pielii detaliată în anexa V sau pentru alte metode de testare de tip adjuvant, un răspuns de cel puțin 30 % din animale se consideră pozitiv;

— pentru orice altă metodă de testare, un răspuns de cel puțin 15 % animale se consideră pozitiv.

3.2.7.3. *Urticarie imunologică cutanată de contact*

Unele substanțe sau preparate, care îndeplinesc criteriile pentru R42 mai pot să provoace și urticaria imunologică cutanată de contact. În cazurile respective, se includ datele referitoare la urticaria cutanată de contact prin utilizarea frazelor S corespunzătoare, de obicei S24 și S36/37 și în fișele tehnice de securitate.

Pentru substanțele sau preparatele care produc semne de urticarie imunologică cutanată de contact care nu îndeplinesc criteriile pentru R42, se ia în considerație clasificarea cu R43.

Nu se cunoaște un model animal disponibil pentru identificarea substanțelor care provoacă urticaria imunologică cutanată de contact. Prin urmare, clasificarea se bazează de obicei pe dovezile umane care vor fi similare cu cele pentru sensibilizarea pielii (R43).

3.2.8. Alte proprietăți toxicologice

Se atribuie fraze de risc suplimentare, în conformitate cu criteriile prezentate în continuare (pe baza experienței obținute în timpul elaborării anexei I), substanțelor și preparatelor clasificate în temeiul punctelor 2.2.1-3.2.7 și/sau punctelor 4 și 5:

R29 Degajă gaze toxice în contact cu apa

Pentru substanțele și preparatele care în contact cu apa sau aerul umed degajă gaze foarte toxice/toxice în cantități posibil periculoase, de exemplu, fosfura de aluminiu, pentasulfura de fosfor.

R31 Degajă gaz toxic în contact cu un acid

Pentru substanțele și preparatele care reacționează cu acizii pentru a degaja gaze toxice în cantități periculoase, de exemplu, hipocloritul de sodiu, polisulfura de bariu. Pentru substanțele utilizate de membrii publicului larg, ar fi mai potrivită utilizarea S50 [nu se amestecă cu … (pe care urmează să o specifice producătorul)].

R32 Degajă gaz foarte toxic în contact cu un acid

Pentru substanțele și preparatele care reacționează cu acizii pentru a degaja gaze foarte toxice în cantități periculoase, de exemplu, săruri ale acidului cianhidric, azida de sodiu. Pentru substanțele utilizate de membrii publicului larg, ar fi mai potrivită utilizarea S50 [nu se amestecă cu … (pe care urmează să o specifice producătorul)].

R33 Pericol de efecte cumulate

Pentru substanțe și preparate, când acumularea în organismul uman poate să producă o anumită îngrijorare care, totuși, nu este suficientă pentru a justifica utilizarea R48.

Pentru explicații privind utilizarea frazei R, a se vedea punctul 4.2.3.3 pentru substanțe și anexa V partea A.3 la Directiva 1999/45/CE pentru preparate.

R64 Poate provoca efecte adverse la sugari

Pentru substanțele și preparatele care sunt absorbite de femei și pot să interfereze cu lactația sau pot să fie prezente (inclusiv metaboliții) în laptele de la sân în cantități suficiente pentru a produce îngrijorare pentru sănătatea unui sugar.

Pentru explicații privind utilizarea frazei R, a se vedea punctul 4.2.3.3 pentru substanțe și anexa V partea A.4 la Directiva 1999/45/CE pentru preparate.

R66 Expunerea repetată poate provoca uscarea sau crăparea pielii

Pentru substanțele și preparatele care pot produce îngrijorare ca urmare a uscării, descuamării sau crăpării pielii, dar care nu îndeplinesc criteriile pentru R38, pe baza, fie:

— a observațiilor practice după manipularea și utilizarea normală, fie

— a dovezilor relevante referitoare la efectele preconizate ale acestora asupra pielii.

A se vedea și punctele 1.6 și 1.7.

R67 Inhalarea vaporilor poate provoca somnolență și amețeală

Pentru substanțele volatile și preparatele ce conțin astfel de substanțe, care dau simptoame clare de inhibare a sistemului nervos central prin inhalare și care nu sunt clasificate încă în privința toxicității acute prin inhalare (R20, R23, R26, R68/20, R39/23 sau R39/26).

Se pot utiliza următoarele dovezi:

(a) datele de la studiile pe animale care prezintă semne clare de inhibare a sistemului nervos central, ca efecte narcotice, letargie, lipsa coordonării (inclusiv pierderea reflexului de redresare) și ataxie, fie:

— la concentrații/timpi de expunere de maximum 20 mg/l/4h, fie

— pentru care raportul dintre concentrația de efect la ≤ 4 h și concentrația vaporilor saturați (CVS) la 20 °C este ≤ 1/10;

(b) experiența practică la oameni (de exemplu, narcoză, somnolență, atenție redusă, pierderea reflexelor, lipsa coordonării, vertij) din rapoarte bine documentate în condiții de expunere comparabile cu efectele specificate anterior la animale.

A se vedea și punctele 1.6 și 1.7.

Pentru alte fraze de risc, a se vedea punctul 2.2.6.

4. CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE EFECTELE SPECIFICE ASUPRA SĂNĂTĂȚII OAMENILOR

4.1. **Introducere**

4.1.1. Prezentul capitol stabilește procedura pentru clasificarea substanțelor care pot să aibă efectele menționate în continuare. Pentru preparate, a se vedea punctul 4.2.4.

4.1.2. Dacă un producător, distribuitor sau importator deține informații disponibile care indică faptul că o substanță ar trebui clasificată și etichetată în conformitate cu criteriile prezentate la punctul 4.2.1, 4.2.2 sau 4.2.3, acesta procedează la etichetarea provizorie a substanței în conformitate cu criteriile menționate, după ce o persoană competentă a evaluat dovezile.

4.1.3. Producătorul, distribuitorul sau importatorul prezintă de îndată ce este posibil un document care rezumă toate datele relevante unui stat membru în care substanța este introdusă pe piață. Datele relevante în contextul de față conțin, în special, toate datele disponibile publicate și nepublicate, necesare pentru clasificarea corespunzătoare a substanței în discuție, în funcție de proprietățile intrinseci conform categoriilor stabilite în articolul 2 alineatul (2) și în conformitate cu criteriile din prezenta anexă. Documentul concis prezentat include o bibliografie ce conține referințele bibliografice relevante, inclusiv datele nepublicate relevante.

4.1.4. În plus, un producător, distribuitor sau importator care deține date noi care sunt relevante pentru clasificarea și etichetarea unei substanțe, în conformitate cu criteriile prezentate la punctul 4.2.1, 4.2.2 sau 4.2.3, prezintă datele respective de îndată ce este posibil unui stat membru în care substanța este introdusă pe piață.

4.1.5. Pentru a obține cât se poate de repede o clasificare armonizată pentru Comunitate prin procedura specificată în articolul 28 din prezenta directivă, statele membre care dețin date relevante disponibile, care justifică clasificarea unei substanțe în una din categoriile respective, fie că sunt prezentate de producător sau nu, prezintă Comisiei de îndată ce este posibil aceste date împreună cu sugestiile pentru clasificare și etichetare.

Comisia înaintează celorlalte state membre propunerea de clasificare și etichetare pe care o primește. Orice stat membru poate să solicite Comisiei datele pe care aceasta le-a primit.

Orice stat membru care are motive întemeiate să considere că propunerea de clasificare și etichetare este necorespunzătoare în privința efectelor cancerigene, mutagene sau de toxicitate asupra reproducerii, notifică acest lucru Comisiei.

4.2. **Criterii pentru clasificare, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc**

4.2.1. Substanțe cancerigene

Pentru clasificare și etichetare și având în vedere stadiul actual al cunoștințelor, aceste substanțe se împart în trei categorii:

Categoria 1

Substanțele cunoscute ca fiind cancerigene pentru om. Există dovezi suficiente pentru stabilirea unei legături cauzale între expunerea oamenilor la o substanță și apariția cancerului.

Categoria 2

Substanțele care se consideră ca și cum ar fi cancerigene pentru om. Există dovezi suficiente pentru a oferi o justificare solidă că expunerea oamenilor la o substanță poate duce la apariția cancerului, în general prin:

— studii corespunzătoare, pe termen lung pe animale;

— alte date relevante.

Categoria 3

Substanțele care constituie o cauză de îngrijorare pentru om datorită posibilelor efecte cancerigene, dar în privința cărora datele disponibile nu sunt potrivite pentru o evaluare satisfăcătoare. Există unele dovezi din studiile corespunzătoare pe animale, dar acestea sunt insuficiente pentru a situa substanța în categoria 2.

4.2.1.1. *Se aplică următoarele simboluri și fraze de risc:*

Categoriile 1 și 2

Substanțelor clasificate în categoria cancerigenă 1 sau 2 li se atribuie simbolul „T” și fraza de risc

R45 Poate provoca apariția cancerului

Cu toate acestea, substanțelor și preparatelor care prezintă un risc cancerigen numai la inhalare, de exemplu, sub formă de praf, vapori sau abur, (alte rute de expunere, de exemplu prin înghițire sau contact cu pielea nu prezintă risc cancerigen), li se atribuie simbolul „T” și fraza de risc

R49 Poate provoca apariția cancerului prin inhalare

Categoria 3:

Substanțelor clasificate drept cancerigene în categoria 3 li se atribuie simbolul „Xn” și fraza de risc

R40 Cunoștințe limitate despre efecte cancerigene

4.2.1.2. *Explicații referitoare la clasificarea pe categorii a substanțelor cancerigene*

Repartizarea unei substanțe în categoria 1 se face pe baza datelor epidemiologice; repartizarea în categoriile 2 și 3 se face în principal pe baza experimentărilor pe animale.

Pentru clasificare în categoria 2 cancerigenă, trebuie să existe fie rezultate pozitive la două specii de animale, fie dovezi pozitive clare la o specie, împreună cu dovezi susținătoare cum sunt datele de genotoxicitate, studiile metabolice sau biochimice, inducerea tumorilor benigne, relația structurală cu alte cancerigene cunoscute sau date din studii epidemiologice care sugerează o asociere.

Categoria 3 conține de fapt 2 subcategorii:

(a) substanțele care sunt bine studiate, dar pentru care dovezile unui efect de inducere a tumorilor sunt insuficiente pentru clasificarea în categoria 2. Nu se estimează că experimentările suplimentare ar aduce alte informații relevante pentru clasificare;

(b) substanțele care sunt studiate insuficient. Datele disponibile nu sunt corespunzătoare, dar produc îngrijorare pentru om. Acest tip de clasificare este provizorie; sunt necesare alte experimentări înaintea luării unei decizii finale.

Pentru a face deosebire între categoriile 2 și 3, sunt relevante argumentele enumerate în continuare, care reduc importanța inducerii experimentale a tumorii având în vedere posibila expunere a oamenilor. Argumentele de față, în special combinate, ar conduce în majoritatea cazurilor la clasificarea în categoria 3, chiar dacă tumoarea a fost indusă la animale:

— efecte cancerigene numai la doze mari care sunt mai mari sau egale cu „doza maximă tolerată". Doza maximă tolerată se caracterizează prin efectele toxice care, deși nu reduc încă durata de viață, merg alături de modificările fizice ca întârzierea cu aproximativ 10 % a creșterii în greutate;

— apariția tumorilor, în special la doze mari, numai la anumite organe de la anumite specii cunoscute ca fiind susceptibile la formarea în mare măsură de tumori spontane;

— apariția tumorilor, numai la locul aplicării, în sisteme de teste foarte sensibile (de exemplu, aplicarea intraperitoneală sau subcutanată a anumitor compuși cu activitate locală), dacă ținta specială nu este relevantă pentru om;

— lipsa genotoxicității în testele pe termen scurt *in vivo* și *in vitro*;

— existența unui mecanism secundar de acțiune cu implicarea unui prag practic peste o doză de un anumit nivel (de exemplu, efectele hormonale asupra organelor țintă sau asupra mecanismelor de reglare fiziologică, stimulare cronică a proliferării celulelor);

— existența unui mecanism specific speciilor de formare a tumorilor (de exemplu, pe căi metabolice specifice) care nu este relevant pentru om.

Pentru a face deosebirea între categoria 3 și fără clasificare, există argumente relevante care exclud pericolul pentru om:

— o substanță nu se clasifică în nici o categorie, dacă se identifică în mod clar mecanismul formării experimentale a tumorii, cu dovezi valabile că acest proces nu se poate extrapola la om;

— dacă singurele date disponibile se referă la tumorile la ficat la anumite specii sensibile de șoareci, fără alte dovezi suplimentare, substanța nu se clasifică în nici o categorie;

— trebuie să se acorde o atenție deosebită în cazurile în care singurele date disponibile referitoare la tumori sunt apariția neoplasmelor în locurile și la speciile unde se cunoaște foarte bine că acestea apar spontan cu o mare incidență.

4.2.2. Substanțe mutagene

4.2.2.1. Pentru clasificare și etichetare și având în vedere stadiul actual al cunoștințelor, aceste substanțe se împart în trei categorii:

Categoria 1

Substanțele cunoscute ca fiind mutagene pentru om.

Există dovezi suficiente pentru a stabili o asociere cauzală între expunerea umană și dereglarea geneticii ereditare.

Categoria 2

Substanțele care se consideră ca și cum ar fi mutagene pentru om.

Există dovezi suficiente pentru o puternică supoziție că expunerea oamenilor la o substanță poate genera dereglarea geneticii ereditare, în general prin:

— studii corespunzătoare pe animale;

— alte date relevante.

Categoria 3

Substanțele care ridică probleme pentru om datorită posibilelor efecte mutagene. Există dovezi din studiile corespunzătoare de efecte mutagene dar acestea sunt insuficiente pentru a situa substanța în categoria 2.

4.2.2.2. *Se aplică următoarele simboluri și fraze de risc:*

Categoriile 1 și 2

Substanțelor clasificate în categoria mutagenă 1 sau 2 li se atribuie simbolul „T" și fraza de risc

R46 Poate provoca malformații genetice ereditare

Categoria 3

Substanțelor clasificate drept mutagene în categoria 3 li se atribuie simbolul „Xn" și fraza de risc

R68 Posibil risc de efecte ireversibile

4.2.2.3. *Explicații referitoare la clasificarea pe categorii a substanțelor mutagene*

Definiția termenilor:

O mutație este o modificare permanentă a cantității sau structurii materialului genetic dintr-un organism, care are ca efect o modificare a caracteristicilor fenotipice ale organismului. Modificările pot să includă o singură genă, un bloc de gene sau un întreg cromozom. Efectele care includ gene singure pot să fie o consecință a efectelor asupra bazelor ADN singure (mutații punctiforme) sau ale unor modificări ample, care includ deleții, în interiorul genei. Efectele asupra cromozomilor pot să includă modificări structurale sau numerice. O mutație în celulele sexuale ale organismelor cu reproducere sexuală se poate transmite progeniturilor. Un mutagen este un agent care generează o incidență sporită a mutațiilor.

Este de remarcat că substanțele se clasifică drept mutagene cu trimitere în special la leziunea actinică ereditară a embrionului. Cu toate acestea, tipul rezultatelor care conduc la clasificarea substanțelor chimice în categoria 3: „inducerea unor evenimente relevante din punct de vedere genetic în celulele somatice" mai este considerată în general ca o alertă pentru o posibilă activitate cancerigenă.

Elaborarea metodei pentru determinarea de efecte mutagene este un proces care continuă. Pentru multe teste noi nu sunt disponibile în prezent protocoale și criterii de evaluare standardizate. Pentru evaluarea datelor legate de efectele mutagene, trebuie să se aibă în vedere calitatea efectuării testului și gradul de valabilitate al metodei de testare.

Categoria 1

Pentru a situa o substanță în categoria 1, sunt necesare dovezi pozitive din studii epidemiologice de mutație la oameni. Nu se cunosc exemple de aceste substanțe până în prezent. Se recunoaște că este extrem de dificil

să se obțină informații credibile di n studiile privind incidența mutațiilor la populațiile umane sau posibilele creșteri ale frecvenței lor.

Categoria 2

Pentru a încadra o substanță în categoria 2, sunt necesare rezultate pozitive ale testelor care să arate (a) efecte mutagene, sau (b) alte interacțiuni intercelulare care evidențiază efecte mutagene, la celulele sexuale ale mamiferelor *in vivo* , împreună cu dovezi clare că substanța sau un metabolit relevant ajunge la celulele sexuale.

Pentru a încadra o substanță în categoria 2, sunt adecvate în prezent următoarele metode:

2(a) Analize *in vivo* pentru depistarea efectelor mutagene asupra celulelor sexuale:

— test de mutație a locusului;

— test de translocație ereditară;

— test de mutație letală dominantă.

Analizele menționate demonstrează de fapt apariția progeniturilor afectate sau un defect în embrionul care se dezvoltă.

2(b) Analize *in vivo* pentru a evidenția interacțiunea relevantă cu celulele sexuale (de obicei ADN):

— teste de anomalii ale cromozomilor, detectate prin analiză citogenetică, care include aneuploidia, provocată de separarea anormală a cromozomilor;

— test pentru metabolismele cromatidelor surori (SCE);

— test pentru sinteza neprogramată a ADN (UDS);

— analiza legăturii (covalente) a mutagenului la ADN-ul celulelor sexuale;

— analiza altor tipuri de dereglări ale ADN-ului.

Aceste analize oferă dovezi de natură mai mult sau mai puțin indirectă. Rezultatele pozitive ale analizelor menționate ar fi susținute în mod normal de rezultatele pozitive ale analizelor *in vivo* pentru efectele mutagene asupra celulelor somatice, la mamifere sau oameni [a se vedea la categoria 3, de preferință metodele de la 3(a)].

2(c) Analize *in vivo* pentru a evidenția efectele mutagene din celulele somatice la mamifere [a se vedea la 3(a)], în combinație cu metodele toxicocinetice, sau alte metodologii care pot să demonstreze că un compus sau un metabolit relevant ajunge în celulele sexuale.

Pentru 2(b) și 2(c), rezultatele pozitive din analizele mediate de gazdă sau demonstrarea efectelor neechivoce ale analizelor *in vitro* se pot considera ca dovezi susținătoare.

Categoria 3

Pentru a încadra o substanță în categoria 3, sunt necesare rezultatele pozitive în analize *in vivo* care să evidențieze (a) efectele mutagene sau (b) altă interacțiune celulară relevantă pentru aceste efecte, din celulele somatice la mamifere. Aceasta din urmă în special ar fi susținută în mod normal de rezultatele pozitive din analizele *in vitro* pentru depistarea efectelor mutagene.

Pentru efectele din celulele somatice *in vivo* în prezent sunt adecvate următoarele metode:

3(a) Analize *in vivo* pentru depistarea efectelor mutagene asupra celulelor somatice:

— test de micronucleu al măduvei osoase sau analiza metafazei;

— analiza metafazei limfocitelor periferice;

— test în picătură pentru culoarea gri.

3(b) Analize *in vivo* de interacțiune a ADN din celulele somatice:

— test pentru SCE în celulele somatice;

— test pentru UDS în celulele somatice;

— analiză pentru legătura (covalentă) a mutagenului la ADN din celulele somatice;

— analiza pentru dereglarea AND, de exemplu, prin eluție alcalină, din celulele somatice.

Substanțele care prezintă rezultate pozitive numai în una sau mai multe analize pentru depistarea efectelor mutagene *in vitro* nu se clasifică în mod normal. Cu toate acestea, se indică cu tărie continuarea studiului, utilizând analize *in vivo*. În cazuri excepționale, de exemplu pentru o substanță care prezintă răspunsuri pronunțate în câteva analize *în vitro* pentru care nu există date *in vivo* și care prezintă similitudini cu mutagenii/cancerigenii cunoscuți, se poate lua în considerare clasificarea în categoria 3.

4.2.3. Substanțe toxice pentru reproducere

4.2.3.1. Pentru clasificare și etichetare și având în vedere stadiul actual al cunoștințelor, aceste substanțe se împart în trei categorii:

Categoria 1

Substanțe cunoscute că afectează fertilitatea la oameni

Există dovezi suficiente pentru a stabili o relație cauzală între expunerea oamenilor la substanță și fertilitatea afectată.

Substanțe cunoscute că provoacă toxicitate evolutivă la oameni

Există dovezi suficiente pentru a stabili o relație cauzală între expunerea oamenilor la substanță și efectele toxice evolutive ulterioare la urmași.

Categoria 2

Substanțe care ar trebui să fie considerate ca și cum ar afecta fertilitatea la oameni

Există dovezi suficiente pentru a crede cu convingere că expunerea oamenilor la substanță poate avea ca efect afectarea fertilității, pe baza:

— dovezilor clare, din studiile pe animale, ale afectării fertilității în absența efectelor toxice sau dovezi ale fertilității afectate care apare la aproximativ aceleași doze ca și alte efecte toxice, dar care nu sunt o consecință nespecifică secundară a celorlalte efecte toxice;

— altor informații relevante.

Substanțe care ar trebui să fie considerate ca și cum ar provoca toxicitate evolutivă la oameni

Există dovezi suficiente pentru a crede cu convingere că expunerea oamenilor la substanță poate avea ca efect toxicitatea evolutivă, în general pe baza:

— rezultatelor clare ale studiilor corespunzătoare pe animale, în care s-au observat efecte în absența semnelor de toxicitate maternă importantă sau la aproximativ aceleași doze ca și alte efecte toxice, dar care nu sunt o consecință nespecifică secundară a celorlalte efecte toxice,

— altor informații relevante.

Categoria 3

Substanțe care produc îngrijorare pentru fertilitatea oamenilor

În general pe baza:

— rezultatelor din studiile corespunzătoare pe animale care oferă dovezi suficiente pentru a produce o suspiciune puternică de fertilitate afectată în absența efectelor toxice sau dovezi de fertilitate afectată care apar la aproximativ aceleași doze ca și alte efecte toxice, dar care nu sunt o consecință nespecifică secundară a celorlalte efecte toxice, dar în care dovezile sunt insuficiente pentru a situa substanța în categoria 2;

— altor informații relevante.

Substanțe care produc îngrijorare pentru oameni datorită unor posibile efecte toxice evolutive

În general pe baza:

— rezultatelor din studiile corespunzătoare pe animale care oferă dovezi suficiente pentru a produce o suspiciune puternică de toxicitate evolutivă în absența semnelor de toxicitate maternă însemnată sau la aproximativ aceleași doze ca și alte efecte toxice, dar care nu sunt o consecință nespecifică secundară a celorlalte efecte toxice, dar în care dovezile sunt insuficiente pentru a situa substanța în categoria 2;

— altor informații relevante.

4.2.3.2. *Se aplică următoarele simboluri și fraze specifice de risc:*

Categoria 1:

pentru substanțele care afectează fertilitatea la oameni:

Substanțelor clasificate în categoria 1, ca toxice pentru reproducere, li se atribuie simbolul „T” și fraza de risc

R60 Poate fi dăunător fertilității

pentru substanțele care provoacă toxicitate evolutivă:

Substanțelor clasificate în categoria 1, ca toxice pentru reproducere, li se atribuie simbolul „T” și fraza de risc

R61 Poate avea efecte adverse asupra fătului

Categoria 2:

pentru substanțele care ar trebui să fie considerate ca și cum ar afecta fertilitatea la oameni:

Substanțelor clasificate în categoria 2, ca toxice pentru reproducere, li se atribuie simbolul „T” și fraza de risc

R60 Poate fi dăunător fertilității

pentru substanțele care ar trebui să fie considerate ca și cum ar provoca toxicitate evolutivă la oameni:

Substanțelor clasificate în categoria 2, ca toxice pentru reproducere, li se atribuie simbolul „T” și fraza de risc

R61 Poate avea efecte adverse asupra fătului

Categoria 3:

pentru substanțele care produc îngrijorare pentru fertilitatea oamenilor:

Substanțelor clasificate în categoria 3, ca toxice pentru reproducere, li se atribuie simbolul „Xn” și fraza de risc

R62 Posibil risc de afectare a fertilității

pentru substanțele care produc îngrijorare pentru oameni datorită posibilelor efecte toxice evolutive

Substanțelor clasificate în categoria 3, ca toxice pentru reproducere, li se atribuie simbolul „Xn” și fraza de risc

R63 Posibil risc de efecte adverse asupra fătului

4.2.3.3. *Explicații referitoare la clasificarea pe categorii a substanțelor toxice pentru reproducere*

Toxicitatea asupra reproducerii include afectarea funcțiilor sau capacității de reproducere la bărbați și femei și inducerea efectelor nocive neereditare la urmași. Aceasta se poate clasifica în două categorii principale: 1. Efecte asupra fertilității bărbaților și femeilor; 2. Toxicitate evolutivă.

1. Efectele asupra fertilității bărbaților și femeilor includ efectele negative asupra libidoului, comportamentului sexual, orice aspect de spermatogeneză sau ovogeneză sau asupra activității hormonale sau răspunsului fiziologic care să interfereze cu capacitatea de fertilizare, fertilizarea însăși sau evoluția ovulului fertilizat până la și inclusiv nidația.

2. Toxicitatea evolutivă, se consideră în sensul cel mai larg pentru a include orice efect care interferează cu evoluția normală, atât înainte cât și după naștere. Ea include efecte induse sau manifestate înainte de naștere precum și după naștere. Aceasta cuprinde efectele embritoxice/fetotoxice ca greutatea corporală redusă, întârziere de creștere și de dezvoltare, toxicitatea organelor, decesul, avortul, defecte structurale (efecte teratogenice), defecte funcționale, defecte peri-postnatale și afectarea evoluției mentale și fizice postnatale până la și inclusiv evoluția normală la pubertate.

Clasificarea substanțelor chimice ca toxice pentru reproducere este destinată a fi utilizată la substanțele chimice care au o proprietate intrinsecă sau specifică de a produce aceste efecte toxice. Dacă aceste efecte se produc doar ca o consecință secundară nespecifică a altor efecte toxice, substanțele chimice nu se clasifică ca toxice pentru reproduce. Substanțele chimice care ridică cele mai multe probleme sunt cele care sunt toxice pentru reproducere la nivele de expunere care nu produc alte semne de toxicitate.

Situarea unui compus în categoria 1 pentru efectele asupra fertilității și toxicității pentru reproducere se face pe baza datelor epidemiologice. Situarea în categoriile 2 sau 3 se face în principal pe baza datelor obținute pe animale. Datele din studiile *in vitro* sau studiile pe ouă de păsări sunt considerate ca „dovezi susținătoare” și, în absența datelor *in vivo*, ar conduce doar în mod excepțional la clasificare.

La fel ca în majoritatea altor tipuri de efect toxic, se estimează că substanțele care dau dovadă de toxicitate pentru reproducere au un prag sub care efectele negative nu s-ar manifesta. Chiar și atunci când se manifestă efecte clare în studiile pe animale, relevanța pentru oameni poate să fie îndoielnică datorită dozelor administrate, de exemplu, dacă efectele se manifestă doar la doze mari sau dacă există diferențe toxicocinetice însemnate sau calea de administrare nu este cea potrivită. Din aceste motive sau din altele similare, se poate să nu fie garantată clasificarea în categoria 3 sau chiar nici o clasificare.

Anexa V la prezenta directivă specifică un test la valori limită pentru substanțele de toxicitate redusă. Dacă o doză de cel puțin 1 000 mg/kg, administrată oral, nu produce nici o dovadă a efectelor toxice pentru reproducere, s-ar putea să nu se considere necesare studiile pentru alte doze. Dacă există date din studiile efectuate cu doze mai mari decât doza limită menționată anterior, datele respective trebuie să fie evaluate împreună cu alte date relevante. În condiții normale, se consideră că efectele observate numai la doze peste doza limită nu ar conduce neapărat la clasificarea ca „toxic pentru reproducere”.

EFECTELE ASUPRA FERTILITĂȚII

Pentru clasificarea unei substanțe în categoria 2, pentru afectarea fertilității, ar trebui să existe în mod normal o dovadă clară pentru o specie de animale, cu dovezi susținătoare privind mecanismul de acțiune sau locul acțiunii sau o relație chimică cu alți agenți anticoncepționali cunoscuți sau alte informații de la oameni care să conducă la concluzia că efectele respective ar putea să fie întâlnite la oameni. Dacă există studii doar pentru o specie, fără alte dovezi susținătoare relevante, atunci clasificarea în categoria 3 poate fi potrivită.

Deoarece afectarea fertilității poate să apară ca o însoțire nespecifică a unei toxicități generalizate severe sau dacă există o inaniție severă, se procedează la clasificarea în categoria 2, doar dacă există dovezi despre existența unui anumit grad de specificitate a toxicității pentru sistemul de reproducere. Dacă, în studiile pe animale, s-a demonstrat că afectarea fertilității se datorează împerecherii nereușite, atunci pentru clasificarea în categoria 2, ar fi necesar în mod normal să existe dovezi privind mecanismul de acțiune, pentru a interpreta dacă este posibilă apariția efectelor negative, ca de exemplu modificarea modului de secreție hormonală la oameni.

TOXICITATEA EVOLUTIVĂ

Pentru clasificarea în categoria 2, trebuie să existe dovezi clare ale efectelor negative în studii bine realizate pe una sau mai multe specii. Deoarece efectele negative la sarcină și după sarcină pot să apară ca o consecință secundară a toxicității materne, alimentației sau administrării reduse de apă la mamă, stresului mamei, absenței grijii materne, deficiențelor alimentare specifice, creșterii proaste a animalelor, infecțiilor intervenite pe parcurs ș.a.m.d., este important ca efectele observate să apară în studii bine realizate și la doze care nu au legătură cu o toxicitate maternă însemnată. și calea de expunere este importantă. În special, injectarea unui material iritant intraperitoneal poate să conducă la leziune locală pe uter sau a conținutului acestuia, iar rezultatele acestor studii trebuie să se interpreteze cu grijă și nu pot, în mod normal, să conducă prin ele însele la clasificare.

Clasificarea în categoria 3 se face în funcție de criterii similare ca la categoria 2, dar acestea se pot utiliza, dacă protocolul experimental prezintă deficiențe care fac concluziile mai puțin convingătoare sau dacă nu se poate exclude posibilitatea ca efectele să se fi datorat influențelor nespecifice, ca toxicitatea generalizată.

Dacă singurele efecte înregistrate sunt mici modificări ale incidențelor defectelor spontane, mici modificări ale proporțiilor variantelor comune, ca cele observate la examinarea scheletelor sau mici diferențe în evaluările dezvoltării postnatale, se procedează, în general, la clasificarea în categoria 3 sau în nici o categorie în mod ad-hoc.

Efecte în timpul lactației

Este necesar ca substanțele care se clasifică drept toxice pentru reproducere și care mai produc îngrijorare datorită efectelor acestora asupra lactației să mai fie etichetate cu R64 (a se vedea criteriile de la punctul 3.2.8).

Pentru clasificare, efectele toxice asupra progeniturilor care rezultă doar din expunerea prin laptele supt sau efectele toxice rezultate din expunerea directă a copiilor nu se vor considera „Toxice pentru reproducere”, cu excepția cazului în care aceste efecte afectează dezvoltarea progeniturilor.

Este necesar ca substanțele care nu se clasifică drept toxice pentru reproducere, dar care produc îngrijorare datorită toxicității atunci când sunt transferate copilului în timpul perioadei de alăptare, să fie etichetate cu R64 (a se vedea criteriile de la punctul 3.2.8). Fraza R menționată poate să fie potrivită și pentru substanțele care afectează cantitatea sau calitatea laptelui.

R64 se poate atribui în mod normal pe baza:

(a) studiilor toxicocinetice care să indice posibilitatea ca substanța să fie prezentă la nivele posibil toxice în laptele de la sân și/sau

(b) rezultatelor studiilor pe una sau două generații de animale care să indice prezența efectelor negative asupra progeniturilor datorită transferului prin lapte și/sau

(c) dovezilor de la oameni care să indice un risc pentru prunci în timpul perioadei de lactație.

Substanțele despre care se cunoaște că se acumulează în organism și care ulterior pot fi eliminate în lapte în timpul alăptării se pot eticheta cu R33 și R64.

4.2.4. Procedeu de clasificare a preparatelor în funcție de efectele specifice asupra sănătății

Dacă un preparat conține una sau mai multe substanțe clasificate în funcție de criteriile menționate anterior, acesta trebuie clasificat după criteriile din anexa II, partea A.7-9 și partea B.6 la Directiva 1999/45/CE (valorile concentrațiilor limită există fie în anexa I la prezenta directivă, fie în anexa II, partea B.6 la Directiva 1999/45/CE, unde substanța sau substanțele în discuție nu apar în anexa I sau apar fără valorile concentrațiilor limită).

5. CLASIFICAREA ÎN FUNCȚIE DE EFECTELE ASUPRA MEDIULUI

5.1. **Introducere**

Principalul obiectiv al clasificării substanțelor și preparatelor periculoase pentru mediu este să avertizeze utilizatorul în privința riscurilor pe care le prezintă pentru ecosisteme aceste substanțe și preparate. Chiar dacă prezentele criterii se referă la sistemele ecoacvatice, este cunoscut faptul că anumite substanțe și preparate pot să afecteze, simultan sau alternativ, alte ecosisteme, ale căror componente variază de la microflora și microfauna solului până la primate.

Criteriile stabilite mai jos provin direct din metodele de testare stabilite în anexa V acolo unde sunt menționate. Metodele de testare necesare pentru „dosarul de bază" menționat în anexa VII sunt limitate și informațiile obținute prin acestea se pot dovedi insuficiente pentru o clasificare adecvată. Clasificarea poate necesita date suplimentare provenind de la nivelul 1 (anexa VIII) sau din alte studii echivalente. În plus, substanțele clasificate pot fi supuse unei revizuiri care să ia în considerare informații noi.

În scopul clasificării și etichetării și având în vedere starea actuală a cunoștințelor în materie, aceste substanțe și preparate se împart în două grupe, în funcție de efectele lor acute și pe termen lung în sistemele acvatice, sau în funcție de efectele lor acute și pe termen lung în sistemele neacvatice.

5.1.1. Clasificarea substanțelor se efectuează în general pe baza datelor experimentale referitoare la toxicitatea acută pentru sistemele acvatice, degradare și log P_{oa} (sau BCF dacă este disponibil).

5.1.2. Clasificarea preparatelor se efectuează în mod obișnuit plecând de la rezultatele obținute printr-o metodă convențională menționată la articolul 7 din și anexa III la Directiva 1999/45/CE, părțile A și B. În acest caz, clasificarea se întemeiază pe limitele concentrațiilor individuale care figurează:

— în anexa I la prezenta directivă,

— sau în anexa III la Directiva 1999/45/CE, partea B, atunci când substanța sau substanțele nu apar în anexa I la prezenta directivă sau apar fără limitele concentrațiilor.

5.1.3. În mod normal, clasificarea unui preparat se face pe baza unei metode convenționale. Cu toate acestea, pentru determinarea toxicității acvatice acute, pot exista cazuri în care este adecvată supunerea preparatului la teste. Rezultatul acestor teste poate numai să modifice clasificarea privitoare la toxicitatea acvatică acută care ar fi fost obținută prin aplicarea unei metode convenționale. Dacă alegerea unor astfel de teste se face de către persoana responsabilă de introducerea pe piață a substanțelor, trebuie să se asigure respectarea criteriilor de calitate pentru metodele de testare din anexa V partea C din prezenta directivă. În plus, testele urmează să fie efectuate pe toate cele trei grupuri de specii, în conformitate cu criteriile prezentei anexe (alge, dafnia și pești), în afara cazului în care preparatul a fost clasificat în categoria corespunzătoare riscului maxim în ceea ce privește toxicitatea acvatică acută după testarea uneia din specii sau dacă nu a existat deja un rezultat disponibil înainte de intrarea în vigoare a Directivei 1999/45/CE.

5.2. **Criterii pentru clasificare, indicarea pericolului, alegerea frazelor de risc**

Criteriile de clasificare pentru substanțele de la punctul 5.2.1 se aplică numai preparatelor care au fost testate în conformitate cu 5.1.3.

5.2.1. Mediul acvatic

5.2.1.1. Substanțele sunt clasificate ca periculoase pentru mediu și li se atribuie simbolul „N" și indicația de pericol corespunzătoare precum și frazele de risc în conformitate cu următoarele criterii:

R50 Foarte toxic pentru organismele acvatice și

R53 Poate provoca efecte adverse pe termen lung în mediul acvatic

Toxicitate acută		96 h LC_{50} (pentru pește)	≤ 1 mg/l
	sau	48 h EC_{50} (pentru dafnia)	≤ 1 mg/l
	sau	72 h IC_{50} (pentru alge)	≤ 1 mg/l

și:

— substanța nu este ușor degradabilă sau

— log P_{oa} (logaritmul coeficientului de partiție octanol/apă) ≥ 3,0 (dacă BCF determinat experimental nu este ≤ 100).

R50 Foarte toxic pentru organismele acvatice

Toxicitate acută		96 h LC_{50} (pentru pește)	≤ 1 mg/l
	sau	48 h EC_{50} (pentru dafnia)	≤ 1 mg/l
	sau	72 h IC_{50} (pentru alge)	≤ 1 mg/l

R51 Toxic pentru organismele acvatice și

R53 Poate provoca efecte adverse pe termen lung în mediul acvatic

Toxicitate acută		96 h LC_{50} (pentru pește)	1 mg/l < LC_{50} ≤ 10 mg/l
	sau	48 h EC_{50} (pentru dafnia)	1 mg/l < EC_{50} ≤ 10 mg/l
	sau	72 h IC_{50} (pentru alge)	1 mg/l < IC_{50} ≤ 10 mg/l

și:

— substanța nu este ușor degradabilă sau

— log P_{oa} ≥ 3,0 (dacă BCF determinat experimental nu este ≤ 100).

5.2.1.2. Substanțele sunt clasificate ca periculoase pentru mediu în conformitate cu criteriile stabilite în continuare. Frazele de risc sunt de asemenea atribuite în conformitate cu următoarele criterii:

R52 Nociv pentru organismele acvatice și

R53 Poate provoca efecte adverse pe termen lung în mediul acvatic

Toxicitate acută		96 h LC_{50} (pentru pește)	10 mg/l < LC_{50} ≤ 100 mg/l
	sau	48 h EC_{50} (pentru dafnia)	10 mg/l < EC_{50} ≤ 100 mg/l
	sau	72 h IC_{50} (pentru alge)	10 mg/l < IC_{50} ≤ 100 mg/l

și

substanța nu este ușor degradabilă.

Acest criteriu se aplică dacă nu există dovezi științifice suplimentare privind degradarea și toxicitatea suficiente pentru a reprezenta o asigurare adecvată că nici substanța nici produsele sale de degradare nu constituie un potențial pericol pe termen lung și cu efect întârziat pentru sistemul acvatic. Astfel de dovezi științifice suplimentare se întemeiază în mod normal pe studiile cerute la nivelul 1 (anexa VIII) sau pe studii de valoare echivalentă și pot cuprinde:

(i) potențial dovedit de degradare rapidă în mediul acvatic;

(ii) absența efectelor toxice cronice la concentrația de 1,0 mg/l, de exemplu, concentrație fără efect observabil mai mare de 1,0 mg/l determinată într-un studiu de toxicitate pe termen lung cu pește sau dafnie.

R52 Nociv pentru organismele acvatice

Substanțele care nu intră în criteriile enumerate anterior în acest capitol, dar care, pe baza probelor disponibile referitoare la toxicitatea lor prezintă totuși pericol pentru structura și funcționarea ecosistemelor acvatice.

R53 Poate provoca efecte adverse pe termen lung în mediul acvatic

Substanțele care nu intră în criteriile enumerate anterior în acest capitol, dar care, pe baza probelor disponibile referitoare la persistența, potențialul de acumulare și la destinul și comportamentul previzibil al lor în mediul înconjurător, prezintă totuși un pericol pe termen lung și /sau cu efect întârziat pentru structura și funcționarea ecosistemelor acvatice.

De exemplu, substanțele slab solubile în apă, adică având o solubilitate mai mică de 1 mg/l, sunt reglementate de acest criteriu dacă:

(a) nu sunt ușor degradabile și

(b) log P_{oa} ≥ 3,0 (dacă BCF determinat experimental nu este ≤ 100).

Acest criteriu se aplică dacă nu există dovezi științifice suplimentare privind degradarea și toxicitatea suficiente pentru a reprezenta o asigurare adecvată că nici substanța nici produsele sale de degradare nu constituie un potențial pericol pe termen lung și cu efect întârziat pentru mediul acvatic.

Astfel de dovezi științifice suplimentare se întemeiază în mod normal pe studiile cerute la nivelul 1 (anexa VIII) sau pe studii de valoare echivalentă și pot cuprinde:

(i) potențial dovedit de degradare rapidă în mediul acvatic;

(ii) absența efectelor toxice cronice la limita de solubilitate (la concentrația de 1,0 mg/l), de exemplu,o concentrație fără efect observabil mai mare de limita de solubilitate determinată într-un studiu de toxicitate pe termen lung cu pește sau dafnie.

5.2.1.3. *Explicații privind determinarea IC_{50} pentru alge și a degradabilității*

— acolo unde se poate demonstra în cazul substanțelor puternic colorate că este inhibată creșterea algelor exclusiv ca rezultat al reducerii intensității luminoase, nu trebuie folosită IC_{50} la 72h pentru alge ca bază de clasificare,

— substanțele se consideră ușor degradabile dacă îndeplinesc următoarele criterii:

(a) în studiile de 28 de zile se ating următoarele niveluri de degradare:

— în testele pe baza carbonului organic dizolvat: 70 %;

— în testele pe baza scăderii concentrației de oxigen și a generării dioxidului de carbon: 60 % din maximele teoretice.

Aceste niveluri de biodegradare trebuie atinse în primele 10 zile de la începerea degradării, începutul fiind considerat acel moment în care s-a degradat 10 % din substanță sau

(b) în cazurile în care numai datele NCO și NBO5 sunt disponibile, atunci când NBO5/NCO este mai mare sau egal cu 0,5 sau

(c) în cazurile în care sunt disponibile alte dovezi științifice convingătoare pentru a demonstra că substanța poate fi degradată (biotic și abiotic) în mediul acvatic până la un nivel > de 70 % într-o perioadă de până la 28 de zile.

5.2.2. Mediul neacvatic

5.2.2.1. Substanțele și preparatele sunt clasificate ca periculoase pentru mediu și li se atribuie simbolul „N" și indicația de pericol corespunzătoare, când este cazul, precum și frazele de risc în conformitate cu următoarele criterii:

R54 Toxic pentru floră

R55 Toxic pentru faună

R56 Toxic pentru organismele din sol

R57 Toxic pentru albine

R58 Poate provoca efecte adverse pe termen lung în mediul înconjurător

Substanțele și preparatele care, pe baza probelor disponibile referitoare la toxicitatea, persistența, potențialul de acumulare, precum și la destinul și comportamentul lor în mediu observate sau previzibile, prezintă un pericol imediat, pe termen lung și cu efect întârziat pentru structura și funcționarea ecosistemelor naturale altele decât cele reglementate la 5.2.1. Criteriile detaliate vor fi elaborate ulterior.

5.2.2.2. Substanțele și preparatele sunt clasificate ca periculoase pentru mediu și li se atribuie simbolul „N" și indicație de pericol corespunzătoare, dacă este cazul, precum și frazele de risc în conformitate cu următoarele criterii:

R59 Periculos pentru stratul de ozon

Substanțele care, pe baza probelor disponibile referitoare la proprietățile și la destinul și comportamentul lor în mediu observat sau previzibil, pot prezenta pericol pentru structura și funcționarea stratului stratosferic de ozon. Aici sunt cuprinse substanțele enumerate în anexa I la Regulamentul (CE) nr. 2037/2000 al Consiliului privind substanțele care sărăcesc stratul de ozon (JO L 244, 29.9.2000, p.1) și amendamentele sale ulterioare.

Preparatele sunt clasificate pe baza metodei convenționale menționate la articolul 7 și anexa III la Directiva 1999/45/CE, părțile A și B.

6. ALEGEREA FRAZELOR CU RECOMANDĂRI DE PRUDENȚĂ

6.1. **Introducere**

Frazele de prudență (frazele S) se atribuie substanțelor și preparatelor periculoase în conformitate cu următoarele criterii generale. În plus, pentru anumite preparate, fraza de prudență menționată în anexa V la Directiva 1999/45/CE este obligatorie.

Ori de câte ori producătorul este menționat în capitolul 6, referirea se face la persoana responsabilă de introducerea pe piață a substanței sau a preparatului.

6.2. **Fraze de prudență pentru substanțe și preparate**

S1 *A se păstra sub cheie*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice și corozive.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru acele substanțe și preparate menționate anterior dacă sunt vândute publicului larg.

S2 *A nu se lăsa la îndemâna copiilor*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru toate substanțele și preparatele vândute publicului larg, cu excepția celor clasificate numai ca periculoase pentru mediu.

S3 *A se păstra într-un loc răcoros*

— Aplicabilitate:

— peroxizi organici,

— alte substanțe și preparate periculoase cu punct de fierbere ≤ 40 °C.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru peroxizii organici dacă nu se folosește fraza S47,

— recomandat pentru alte substanțe și preparate periculoase cu punct de fierbere ≤ 40 °C.

S4 *A se păstra departe de zonele locuite*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice și toxice.

— Criterii de folosire:

— în mod normal se limitează la substanțele și preparatele foarte toxice și toxice, când este dezirabilă completarea frazei S13; de exemplu atunci când există riscul inhalării și substanța sau preparatul trebuie depozitat(ă) în afara zonelor de locuit. Fraza nu este destinată excluderii unei folosiri corespunzătoare a substanței sau preparatului în zonele locuite.

S5 *A se păstra în … (lichidul adecvat, de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate solide inflamabile spontan.

— Criterii de folosire:

— în mod normal se limitează la cazuri speciale, de exemplu, sodiu, potasiu sau fosfor alb.

S6 *A se păstra în … (gaz inert, de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate periculoase, care trebuie păstrate în atmosferă de gaz inert.

— Criterii de folosire:

— în mod normal se limitează la cazuri speciale, de exemplu, anumiți compuși organo-metalici.

S7 *A se păstra recipientul bine închis*

— Aplicabilitate:

— peroxizi organici,

— substanțe și preparate care pot să emane gaze foarte toxice, toxice, nocive sau foarte inflamabile,

— substanțe și preparate care în contact cu umezeala emană gaze foarte inflamabile,

— solide ușor inflamabile.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru peroxizii organici,

— recomandată pentru celelalte domenii de aplicare menționate anterior.

S8 *A se menține recipientul uscat*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care pot da reacții violente cu apa,

— substanțe și preparate care în contact cu apa eliberează gaze foarte inflamabile,

— substanțe și preparate care în contact cu apa eliberează gaze foarte toxice sau toxice.

— Criterii de folosire:

— în mod normal se limitează la domeniile de aplicare menționate anterior când este necesară accentuarea avertismentelor date de R14, R15 în special și R29.

S9 *A se păstra recipientul într-un loc bine ventilat*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate volatile, care pot emana vapori foarte toxici, toxici sau nocivi,

— lichide foarte inflamabile sau ușor inflamabile și gaze foarte inflamabile.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțele și preparatele volatile care pot emana vapori foarte toxici, toxici sau nocivi,

— recomandată pentru lichidele foarte inflamabile și ușor inflamabile sau pentru gazele foarte inflamabile.

S12 *A nu se păstra recipientul închis ermetic*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care, emanând gaze sau vapori, pot să aprindă recipientul.

— Criterii de folosire:

— în mod normal se limitează la cazurile speciale menționate anterior.

S13 *A se păstra departe de alimente, băuturi și hrana animalelor*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice și nocive.

— Criterii de folosire:

— recomandată atunci când astfel de substanțe și preparate sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S14 *A se păstra departe de … (materiale incompatibile, de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— peroxizi organici.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru peroxizi organici și în mod normal limitată la aceștia. Cu toate acestea, poate fi folositoare în cazuri excepționale, când incompatibilitatea este probabil să conducă la un risc anume.

S15 *A se feri de căldură*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care se pot descompune sau pot reacționa spontan sub efectul căldurii.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazuri speciale, de exemplu, monomeri, dar neatribuită dacă frazele de risc R2, R3 și/sau R5 au fost deja aplicate.

S16 *A se păstra departe de surse de aprindere. Fumatul interzis.*

— Aplicabilitate:

— lichide foarte inflamabile sau ușor inflamabile și gaze foarte inflamabile.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțele și preparatele menționate anterior, dar neatribuită dacă frazele de risc R2, R3 și/sau R5 au fost deja aplicate.

S17 *A se păstra departe de materiale combustibile*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care pot forma cu materialele combustibile amestecuri explozive sau inflamabile spontan.

— Criterii de folosire:

— disponibilă pentru cazuri speciale, de exemplu, pentru a accentua R8 și R9.

S18 *A se manipula și a se deschide recipientul cu grijă*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate susceptibile de a produce suprapresiune în recipient,

— substanțe și preparate care pot forma peroxizi explozivi.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazurile menționate anterior acolo unde există riscul vătămării ochilor și unde substanțele și preparatele sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S20 *Nu se consumă alimente și băuturi pe durata utilizării*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice și corozive.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazuri speciale (de exemplu, arsenic și compuși ai arsenicului; fluoracetați) în special când oricare din aceste substanțe este susceptibilă de a fi folosită de publicul larg.

S21 *Fumatul interzis pe durata utilizării*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care generează produse toxice prin combustie.

— Criterii de folosire:

— în mod normal, limitată la cazuri speciale (de exemplu, compuși halogenați).

S22 *A nu inspira pulberea*

— Aplicabilitate:

— toate substanțe și preparate solide periculoase pentru sănătate.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie*

— pentru acele substanțe și preparate menționate anterior care sunt furnizate în formă de pulbere inhalabilă și pentru care nu se cunosc pericolele în urma inhalării.

S23 *A nu inspira gazul/fumul/vaporii/aerosolii (exprimarea corespunzătoare, de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele lichide și gazoase care sunt periculoase pentru sănătate.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru acele substanțe și preparate menționate anterior cărora li se atribuie R42,

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele care se folosesc prin pulverizare. Fie S38, fie S51 trebuie să fie atribuită în plus,

— recomandată atunci când este necesar să se atragă atenția utilizatorului asupra riscurilor la inhalare nemenționate în frazele de risc care sunt atribuite.

S24 *A se evita contactul cu pielea*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase pentru sănătate.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru acele substanțe și preparate cărora le-a fost atribuită R43, dacă nu le-a fost atribuită de asemenea și S36,

— recomandată atunci când este necesar să se atragă atenția utilizatorului asupra riscurilor la contactul cu pielea nemenționate în frazele de risc (de exemplu, parestezia) care sunt atribuite. Poate fi folosită și la accentuarea acestor fraze de risc.

S25 *A se evita contactul cu ochii*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase pentru sănătate.

— Criterii de folosire:

— recomandată atunci când este necesar să se atragă atenția utilizatorului asupra riscurilor la contactul cu ochii nemenționate în frazele de risc care sunt atribuite. Poate fi folosită și la accentuarea acestor fraze de risc,

— recomandată pentru substanțele cărora li s-au atribuit R34, R35, R36 sau R41 și sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S26 *În caz de contact cu ochii, se spală imediat cu multă apă și se consultă medicul.*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate corozive sau iritante.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțe și preparate corozive și pentru cele cărora li s-a atribuit deja R41,

— recomandată pentru substanțele și preparatele iritante cărora li s-a atribuit deja fraza de risc R36.

S27 *A se scoate imediat orice îmbrăcăminte contaminată*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice sau corozive.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele foarte toxice cărora li s-a atribuit R27 și care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg,

— recomandată pentru substanțele și preparatele foarte toxice cărora li s-a atribuit R27, folosite în industrie. Cu toate acestea, această frază de prudență nu trebuie folosită dacă a fost atribuită S36,

— recomandată pentru substanțele și preparatele toxice cărora li s-a atribuit R24, ca și pentru substanțele și preparatele corozive care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S28 *În caz de contact cu pielea, se spală imediat cu mult(ă)… (de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice sau corozive.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele foarte toxice,

— recomandată pentru celelalte substanțe și preparate menționate anterior, în special când nu apa este cel mai adecvat fluid de clătire,

— recomandată pentru substanțele și preparatele corozive care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S29 *A nu se arunca în rețeaua de canalizare*

— Aplicabilitate:

— lichide foarte inflamabile sau ușor inflamabile, nemiscibile cu apa,

— substanțe și preparate foarte toxice și toxice,

— substanțe și preparate periculoase pentru mediu.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele periculoase pentru mediu cărora li s-a atribuit simbolul „N”, care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg, dacă nu aceasta este destinația prevăzută,

— recomandată pentru alte substanțe și preparate menționate anterior care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg, dacă nu aceasta este destinația prevăzută.

S30 *A nu se turna niciodată apă în acest produs*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care reacționează violent cu apa.

— Criterii de folosire:

— în mod normal, limitată la cazuri speciale (de exemplu, acid sulfuric) și poate fi folosită, după caz, pentru a da informația în modul cel mai clar posibil, fie accentuând R14, fie ca alternativă la R14.

S33 *A se lua măsuri de precauție împotriva descărcărilor electrostatice*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate extrem de inflamabile sau foarte inflamabile.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțele și preparatele folosite în industrie care nu absorb umezeala. Teoretic, nu se folosește niciodată pentru substanțe și preparate introduse pe piață spre utilizare de către publicul larg.

S35 *A se arunca acest material și recipientul său respectând toate precauțiile*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțe și preparate atunci când sunt necesare instrucțiuni speciale pentru a se asigura o îndepărtare adecvată.

S36 *A se purta echipamentul de protecție corespunzător*

— Aplicabilitate:

— peroxizi organici,

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice sau nocive,

— substanțe și preparate corozive.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele foarte toxice și corozive,

— *obligatorie* pentru acele substanțe și preparate cărora le-a fost atribuită fie R21, fie R24,

— *obligatorie* pentru substanțele cancerigene, mutagene și toxice pentru reproducere de categoria 3, în afara cazului în care efectele se produc numai prin inhalarea substanței sau a preparatului,

— *obligatorie* pentru peroxizii organici,

— recomandată pentru substanțele și preparatele toxice dacă valoarea DL_{50} pe cale cutanată este necunoscută, dar este probabil ca substanța sau preparatul să fie toxic la contactul cu pielea,

— recomandată pentru substanțele și preparatele folosite în industrie care sunt susceptibile de a dăuna sănătății în caz de expunere prelungită la risc.

S37 *A se purta mănuși corespunzătoare*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice, toxice, nocive sau corozive,

— peroxizi organici,

— substanțe și preparate iritante pentru piele sau care produc sensibilizare la contactul cu pielea.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele foarte toxice și corozive,

— *obligatorie* pentru acele substanțe și preparate cărora le-a fost atribuită fie R21, fie R24, sau R43,

— *obligatorie* pentru substanțele cancerigene, mutagene și toxice pentru reproducere de categoria 3, în afara cazului în care efectele se produc numai prin inhalarea substanței sau a preparatului,

— *obligatorie* pentru peroxizii organici,

— recomandată pentru substanțele și preparatele toxice dacă valoarea DL_{50} pe cale cutanată este necunoscută, dar este probabil ca substanța sau preparatul să fie nociv la contactul cu pielea,

— recomandată pentru substanțele și preparatele iritante pentru piele.

S38 *În caz de ventilație insuficientă, a se purta echipament de respirație corespunzător*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice sau toxice.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazuri speciale implicând folosirea substanțelor și preparatelor foarte toxice și toxice în industrie sau în agricultură.

S39 *A se purta mască de protecție a ochilor/feței*

— Aplicabilitate:

— peroxizi organici,

— substanțe și preparate corozive, cuprinzând iritante care prezintă riscul vătămării grave a ochilor,

— substanțe și preparate foarte toxice și toxice.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru acele substanțe și preparate cărora le-a fost atribuită fie R34, R35 sau R41,

— *obligatorie* pentru peroxizii organici,

— recomandată atunci când este necesar să se atragă atenția utilizatorului asupra riscurilor la contactul cu ochii care nu sunt menționate în frazele de risc care au fost atribuite.

— în mod normal, limitată la cazuri excepționale pentru substanțele și preparatele foarte toxice și toxice, atunci când există risc de stropire și este probabil ca acestea să fie ușor absorbite prin piele.

S40 *Pentru a curăța podeaua și obiectele contaminate cu acest produs se folosește… (de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la acele substanțe și preparate pentru care apa nu este considerată un agent de curățare adecvat (de exemplu, atunci când este necesară absorbția pe material pulverulent, dizolvarea în solvent etc.) și acolo unde este important pentru sănătate și motive de securitate să fie prezentat un avertisment pe etichetă.

S41 *A nu inspira fumul în caz de incendiu și explozie*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate periculoase care la combustie emană gaze foarte toxice sau toxice.

— Criterii de folosire:

— limitată în mod normal la cazuri speciale.

S42 *În timpul fumizărilor/pulverizărilor, a se purta un echipament de respirație adecvat (exprimarea corespunzătoare, de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate destinate unei astfel de utilizări care însă pot pune în pericol sănătatea și siguranța utilizatorului dacă nu se iau măsuri de precauție corespunzătoare.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazuri speciale.

S43 *În caz de incendiu se va utiliza… (de precizat exact de către producător mijloacele de stingere. Dacă apa mărește riscurile, se va adăuga „A nu se utiliza apă niciodată")*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte inflamabile, ușor inflamabile și inflamabile.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele care în contact cu apa sau cu aerul umed eliberează gaze foarte inflamabile,

— recomandată pentru substanțele și preparatele foarte inflamabile, ușor inflamabile și inflamabile, în special dacă nu sunt miscibile cu apa.

S45 *În caz de accident sau indispoziție, a se consulta imediat medicul (Dacă este posibil, a i se arăta eticheta)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice,

— substanțe și preparate toxice și corozive,

— substanțe și preparate care provoacă sensibilizare prin inhalare.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele menționate anterior.

S46 *În caz de ingestie, a se consulta imediat medicul și a i se arăta ambalajul sau eticheta*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase altele decât cele care sunt foarte toxice, toxice, corozive sau periculoase pentru mediu.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru toate substanțele și preparatele menționate anterior care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg, dacă nu există pericol la ingerare, în special de către copii.

S47 *A se păstra la o temperatură care nu depășește… °C (de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care devin instabile la o anumită temperatură.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazuri speciale (de exemplu, anumiți peroxizi organici).

S48 *A se păstra umed cu… (materialul adecvat de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care pot deveni foarte sensibile la scântei, frecare sau impact, dacă sunt lăsate să se usuce.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la cazuri speciale, de exemplu, nitrocelulozele.

S49 *A se păstra numai în ambalajul original*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate sensibile la descompunerea catalitică.

— Criterii de folosire:

— substanțe și preparate sensibile la descompunerea catalitică, de exemplu, anumiți peroxizi organici.

S50 *A nu amesteca cu… (de specificat de către producător)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care pot reacționa cu produsul specificat eliberând gaze foarte toxice sau toxice,

— peroxizi organici.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțele și preparatele menționate anterior care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg, acolo unde reprezintă o alternativă mai bună decât R31 sau R32,

— obligatorie cu anumiți peroxizi care pot reacționa violent cu acceleratori sau promotori.

S51 *A se utiliza numai în locuri bine ventilate*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate care este probabil sau sunt destinate să producă vapori, pulberi, aerosoli, fum, ceață etc. și care prezintă risc de inhalare, de incendiu sau de explozie.

— Criterii de folosire:

— recomandată atunci când S38 nu este indicată. Prin urmare este importantă atunci când astfel de substanțe și preparate sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S52 *A nu se utiliza pe suprafețe mari în spații locuite*

— Aplicabilitate:

— substanțe volatile, foarte toxice, toxice și nocive și preparate care le conțin.

— Criterii de folosire:

— recomandată atunci când vătămarea sănătății este probabil să fie provocată de expunerea prelungită la risc datorat acestor substanțe și preparate din cauza volatilizării lor pe suprafețe mari în case sau în alte spații închise în care se pot întruni oameni.

S53 *A se evita expunerea – a se procura instrucțiuni speciale înainte de utilizare*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate cancerigene, mutagene și toxice pentru reproducere.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele menționate anterior cărora le-a fost atribuită cel puțin una din următoarele fraze de risc: R45, R46, R49, R60 sau R61.

S56 *A se îndepărta produsul și ambalajul său prin trimitere la un centru de colectare a deșeurilor periculoase sau speciale*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru toate substanțele și preparatele care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg și pentru care se cere o îndepărtare specială.

S57 *A se utiliza un ambalaj corespunzător pentru a evita contaminarea mediului înconjurător*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate cărora le-a fost atribuit simbolul „N”.

— Criterii de folosire:

— în mod normal limitată la substanțe și preparate care nu sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg.

S59 *Adresați-vă producătorului pentru informații privind recuperarea/reciclarea*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele nocive pentru stratul de ozon,

— recomandată pentru substanțe și preparate pentru care se recomandă recuperarea/reciclarea.

S60 *Acest produs și ambalajul său trebuie îndepărtate ca deșeuri periculoase*

— Aplicabilitate:

— toate substanțele și preparatele periculoase.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțe și preparate care nu sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg și cărora nu le-a fost atribuită S35.

S61 *A se evita aruncarea în mediul înconjurător. A se consulta instrucțiunile speciale/fișele tehnice de securitate*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate periculoase pentru mediu.

— Criterii de folosire:

— în mod normal, folosită pentru substanțele și preparatele cărora le-a fost atribuit simbolul „N”,

— recomandată pentru toate substanțele și preparatele clasificate ca periculoase pentru mediu și nereglementate anterior.

S62 *În caz de ingestie, a nu se provoca voma: a se consulta imediat un medic și a i se arăta ambalajul sau eticheta*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate clasificate ca nocive cu R65 în conformitate cu criteriile de la punctul 3.2.3,

— nu se aplică substanțelor și preparatelor care sunt introduse pe piață sub formă de aerosoli (sau în recipiente prevăzute cu dispozitiv de pulverizare sigilat), a se vedea punctele 8 și 9.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele menționate anterior, dacă sunt vândute către publicul larg sau sunt susceptibile de a fi folosite de acesta, cu excepția cazurilor în care S45 sau S 46 sunt obligatorii,

— recomandată pentru substanțele și preparatele menționate anterior atunci când sunt folosite în industrie, cu excepția cazurilor în care S45 sau S 46 sunt obligatorii.

S63 *În caz de accident prin inhalare, se transportă victima la aer curat și se menține în stare de repaus*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate foarte toxice și toxice (gaze, vapori, particule, lichide volatile),

— substanțe și preparate care provoacă sensibilizare respiratorie.

— Criterii de folosire:

— *obligatorie* pentru substanțele și preparatele cărora le-au fost atribuite R26, R23 sau R42 și care sunt susceptibile de a fi folosite de publicul larg într-un mod din care ar putea rezulta inhalarea.

S64 *În caz de ingestie, se clătește gura cu apă (numai dacă persoana este conștientă)*

— Aplicabilitate:

— substanțe și preparate corozive sau iritante.

— Criterii de folosire:

— recomandată pentru substanțele și preparatele de mai sus susceptibile de a fi folosite de publicul larg și pentru care este adecvat tratamentul de mai sus.

7. ETICHETAREA

7.1. După clasificarea unei substanțe sau preparat, eticheta corespunzătoare este stabilită conform cerințelor articolului 23 din prezenta directivă și articolului 10 din Directiva 1999/45/CE pentru substanțe și, respectiv, preparate. Prezenta secțiune explică modul de stabilire a etichetei și, în special, oferă o orientare asupra modului de alegere a frazelor de risc și a frazelor de prudență adecvate.

Eticheta cuprinde următoarele informații:

(a) pentru preparate, numele comercial sau denumirea;

(b) pentru substanțe, numele substanței, iar pentru preparate, numele substanțelor prezente în preparat, conform normelor enunțate la articolul 10 alineatele (2) și (3) din Directiva 1999/45/CE;

(c) numele, adresa completă și numărul de telefon al persoanei responsabile cu introducerea pe piață a substanței sau a preparatului, fie acesta producător, importator sau distribuitor;

(d) simbolul (simbolurile) și indicația (indicațiile) pentru pericol;

(e) fraze indicând riscuri specificate (fraze R);

(f) fraze indicând recomandările de prudență (fraze S);

(g) pentru substanțe, numărul CE însoțit, în cazul substanțelor care figurează în anexa I, de mențiunea „etichetă CE";

(h) pentru preparatele oferite sau vândute publicului larg, cantitatea nominală a conținutului, dacă nu este specificată în altă parte pe ambalaj.

Observații:

Pentru unele preparate, există cerințe suplimentare de etichetare stabilite la articolul 10 alineatele (1) și (2) și anexa V la Directiva 1999/45/CE și la articolul 20 din Directiva 98/8/CE.

7.1.1. Alegerea finală a frazelor de risc și de prudență

Deși alegerea finală a celor mai adecvate fraze de risc și securitate este determinată, în primul rând, de necesitatea de a furniza toate informațiile necesare, este cazul să se țină seama și de claritatea și impactul etichetei. Obiectivul fiind claritatea, informația necesară ar trebui să fie exprimată într-un număr minim de fraze.

În cazul substanțelor iritante, ușor inflamabile, inflamabile și oxidante, nu este necesară folosirea frazelor R și S atunci când conținutul unui ambalaj nu depășește 125 ml. Acest lucru se aplică și atunci când același volum de substanță nocivă nu este vândut cu amănuntul publicului larg.

În cazul preparatelor, atunci când conținutul unui ambalaj nu depășește 125 ml:

— dacă sunt clasificate ca ușor inflamabile, oxidante, iritante, cu excepția celor cărora li se atribuie fraza R41, sau periculoase pentru mediu și li se atribuie simbolul „N", nu este necesar să se indice frazele R sau frazele S;

— dacă sunt clasificate ca inflamabile sau periculoase pentru mediu și nu li se atribuie simbolul „N", este necesară indicarea frazelor R, dar nu și a frazelor S.

7.1.2. Fără a aduce atingere articolului 16 alineatul (4) din Directiva 91/414/CEE și Directivei 98/8/CE, indicații precum „netoxic", „nenociv" „nepoluant" sau „ecologic" sau orice alt enunț indicând că substanța sau preparatul nu prezintă pericol, sau că nu poate conduce la subestimarea pericolelor prezentate de substanța sau preparatul în cauză, nu trebuie să figureze pe eticheta sau pe ambalajul substanțelor ori preparatelor reglementate de prezenta directivă sau de Directiva 1999/45/CE.

7.2. **Denumirea sau denumirile chimice care figurează pe etichetă**

7.2.1. Pentru substanțele menționate în anexa I, eticheta trebuie să conțină numele substanțelor sub una din denumirile care figurează în anexa I.

Pentru substanțele care nu sunt menționate în anexa I, numele este dat după o nomenclatură chimică recunoscută la nivel internațional, așa cum este definită la punctul 1.4.

7.2.2. Pentru preparate, alegerea numelor care vor figura pe etichetă se face în conformitate cu normele articolului 10 alineatele (2) și (3) din Directiva 1999/45/CE.

Notă:

Sub rezerva dispozițiilor din anexa V B.9 la Directiva 1999/45/CE,

— numele substanței sensibilizante trebuie ales în conformitate cu punctul 7.2.1 din prezenta anexă;

— în cazul preparatelor concentrate destinate industriei parfumurilor:

— persoana responsabilă cu introducerea lor pe piață poate identifica numai acea substanță sensibilizantă pe care o consideră ca principala responsabilă de pericolul sensibilizării;

— în cazul unei substanțe naturale, denumirea chimică poate fi de tipul „ulei esențial de …”, „extract de …”, și nu denumirea constituenților acelui ulei esențial sau extract.

7.3. **Alegerea simbolurilor de pericol**

Forma simbolurilor de pericol și redactarea indicațiilor de pericol trebuie să fie conforme cu acelea stabilite în anexa II. Simbolul este imprimat cu litere negre pe fond galben-portocaliu.

7.3.1. Pentru substanțele menționate la anexa I, simbolurile și indicațiile de pericol sunt cele prezentate în anexă.

7.3.2. Pentru substanțele periculoase care nu sunt încă menționate în anexa I și pentru preparate, simbolurile și indicațiile de pericol sunt atribuite în conformitate cu normele stabilite în prezenta anexă.

Atunci când se aplică mai multe simboluri unei substanțe sau unui preparat:

— obligația aplicării simbolului „E” face facultative simbolurile „F”, „F +” și „O”;

— obligația aplicării simbolurilor „T +” sau „T” face facultative simbolurile „Xn”, „Xi” și „C”;

— obligația aplicării simbolului „C” face facultative simbolurile „Xn” și „Xi”;

— dacă se aplică simbolul „Xn”, simbolul „Xi” devine facultativ.

7.4. **Alegerea frazelor de risc**

Redactarea frazelor R trebuie să fie în conformitate cu aceea stabilită în anexa III.

Frazele R combinate din anexa III trebuie utilizate după caz.

7.4.1. Pentru substanțele menționate în anexa I, frazele R sunt cele prezentate în anexa III.

7.4.2. Pentru substanțele care nu figurează în anexa I, frazele R sunt alese în conformitate cu criteriile și prioritățile următoare:

(a) în cazul pericolelor pentru sănătate:

(i) frazele R corespunzătoare categoriei de pericol ilustrat prin simbol trebuie să figureze pe etichetă;

(ii) frazele R corespunzătoare altor categorii de pericol, care nu sunt ilustrate prin simbol în temeiul articolului 23;

(b) în cazul pericolelor generate de proprietățile fizico-chimice:

— frazele R corespunzătoare categoriei de pericol ilustrat prin simbol trebuie să figureze pe etichetă;

(c) în cazul pericolelor pentru mediu:

— fraza (frazele) R corespunzătoare categoriei „periculos pentru mediu” trebuie să figureze pe etichetă.

7.4.3. Pentru preparate, frazele R sunt alese în conformitate cu criteriile și prioritățile următoare:

(a) în cazul pericolelor pentru sănătate:

(i) frazele R corespunzătoare categoriei de pericol ilustrat prin simbol. În anumite cazuri, frazele R trebuie adoptate în conformitate cu tabelele din anexa II la Directiva 1999/45/CE, partea B. Mai exact, pe etichetă trebuie să figureze frazele R ale constituentului (constituenților) care justifică clasificarea preparatului într-o categorie de pericol;

(ii) frazele R care corespund altor categorii de pericol, aplicate compușilor fără a fi ilustrate printr-un simbol în temeiul articolului 10 alineatele (2) și (4) din Directiva 1999/45/CE;

(b) în cazul pericolelor generate de proprietățile fizico-chimice:

— se aplică criteriile descrise la punctul 7.4.3 litera (a), cu excepția frazelor de risc „foarte inflamabil" sau „ușor inflamabil" care nu trebuie să fie indicate atunci când repetă formularea indicației de pericol reprezentată de simbol;

(c) în cazul pericolelor pentru mediu:

(i) fraza (frazele) R corespunzătoare categoriei „periculos pentru mediu" trebuie să figureze pe etichetă;

(ii) dacă fraza de risc R50 a fost atribuită ca supliment al frazei combinate R51/53 sau al R52/53 sau numai al frazei R53, se folosește fraza de risc combinată R50/53.

Ca normă generală, maximum șase fraze R sunt suficiente pentru descrierea riscului în cazul preparatelor; frazele combinate menționate în anexa III sunt considerate în acest sens drept fraze unice. Cu toate acestea, dacă preparatul intră simultan în mai multe categorii de pericol, acele fraze tip trebuie să acopere toate pericolele principale asociate cu preparatul. În unele cazuri, pot fi necesare mai mult de șase fraze R.

7.5. **Frazele de prudență**

Redactarea frazelor S trebuie să fie în conformitate cu aceea stabilită în anexa IV.

Frazele S combinate din anexa IV trebuie utilizate după caz.

7.5.1. Pentru substanțele care figurează în anexa I, frazele S sunt cele prezentate în anexă. Când nu este prezentată nici o frază S, producătorul/importatorul poate adăuga orice frază (fraze) S corespunzătoare. Pentru substanțele care nu figurează în anexa I și pentru preparate, producătorul trebuie să adauge fraze S conform criteriilor indicate în capitolul 6 al prezentei anexe.

7.5.2. Alegerea frazelor de prudență

Alegerea finală a frazelor de prudență trebuie să țină cont de frazele de risc indicate pe etichetă și de utilizarea prevăzută pentru substanță sau preparat:

— ca normă generală, maximum șase fraze S sunt suficiente pentru formularea celei mai adecvate recomandări de prudență; frazele combinate menționate în anexa IV sunt considerate în acest sens drept fraze unice;

— în cazul frazelor S privind îndepărtarea, trebuie utilizată o frază S dacă nu este evident că îndepărtarea produsului și a recipientului său nu prezintă nici un pericol pentru sănătatea oamenilor sau pentru mediu. Sunt importante în special recomandările referitoare la îndepărtarea în siguranță a substanțelor și preparatelor vândute publicului larg;

— unele fraze R devin inutile dacă se realizează o alegere judicioasă a frazelor S și reciproc; frazele S care corespund în mod evident frazelor R figurează pe etichetă numai dacă se urmărește accentuarea unui anumit avertisment;

— la alegerea frazelor de prudență, se acordă o atenție specială condițiilor prevăzute pentru folosirea anumitor substanțe și preparate, de exemplu, pulverizarea sau orice alte efecte de aerosol. Frazele trebuie alese având în vedere utilizarea prevăzută;

— frazele S1, S2 și S45 sunt obligatorii pentru toate substanțele și preparatele foarte toxice, toxice și corozive vândute publicului larg;

— frazele S2 și S46 sunt obligatorii pentru toate celelalte substanțe și preparate periculoase (cu excepția celor clasificate numai ca periculoase pentru mediu) vândute publicului larg.

Dacă frazele alese strict în conformitate cu criteriile enunțate la 6.2 conduc la redundanță sau ambiguitate sau dacă sunt în mod clar inutile dat fiind specificul produsului/ambalajului, unele fraze pot fi suprimate.

7.6. **Numărul CE**

Dacă o substanță menționată pe etichetă este înscrisă în Inventarul european al substanțelor chimice existenta introduse pe piață (IESCE) sau în Lista europeană a substanțelor notificate (ELINCS), numărul IESCE sau ELINCS al substanței trebuie să figureze pe etichetă. Această cerință nu se aplică la preparate.

7.7. **Dimensiunile etichetei pentru preparate**

Dimensiunile etichetei sunt următoarele:

Capacitatea ambalajului	*Dimensiunile (în milimetri)*
– mai mică sau egală cu 3 l:	dacă este posibil, cel puțin 52 × 74
– mai mare de 3 l, dar care nu depășește 50 l:	cel puțin 74 × 105
– mai mare de 50 l, dar care nu depășește 500 l:	cel puțin 105 × 148
– peste 500 l:	cel puțin 148 × 210

Fiecare simbol trebuie să ocupe cel puțin o zecime din suprafața etichetei dar să aibă o suprafață de cel puțin 1 cm^2. Eticheta trebuie să fie bine fixată pe una sau mai multe fețe ale ambalajului care este în contact direct cu preparatul.

Informațiile de pe etichetă trebuie să se detașeze clar de fondul etichetei și să fie de mărime corespunzătoare, cu spații suficiente, așa încât să fie ușor de citit.

8. CAZURI SPECIALE: Substanțe

8.1. **Butelii mobile de gaz**

Pentru buteliile mobile de gaz se consideră că sunt respectate prescripțiile referitoare la etichetare atunci când sunt în conformitate cu articolul 23 sau cu articolul 24 alineatul (6) litera (b).

Cu toate acestea, prin derogare de la articolul 24 alineatele (1) și (2), pentru buteliile de gaz cu capacitate normală mai mică sau egală cu 150 l, poate fi folosită una din următoarele alternative:

— formatul și dimensiunile etichetei pot să se conformeze prescripțiilor standardului ISO 7225 (ediția 1994) referitoare la „Butelii de gaz - Etichete de risc”,

— informațiile specificate la articolul 23 alineatul (2) pot fi furnizate pe un disc sau o eticheta rezistentă cu fixare permanentă pe butelie.

8.2. **Recipiente de gaz pentru propan, butan sau gaz petrolier lichefiat (GPL)**

Aceste substanțe sunt clasificate în anexa I. Deși clasificarea lor este în conformitate cu articolul 2, ele nu prezintă pericol pentru sănătatea oamenilor atunci sunt introduse pe piață în butelii închise reîncărcabile sau în cartușe nereîncărcabile din sfera de aplicare a EN 417, ca gaze combustibile care urmează să fie eliberate din recipient numai în vederea combustiei (EN 417, ediția septembrie 1992 referitoare la „Cartușe metalice nereîncărcabile pentru gaze petroliere lichefiate, cu sau fără ventil, destinate alimentării aparatelor portabile: execuție, verificare, testare și marcare”).

Aceste butelii și cartușe trebuie etichetate cu simbolul corespunzător și frazele R și S privind inflamabilitatea. Nu se cere indicarea pe etichetă a informațiilor referitoare la efectele asupra sănătății oamenilor. Cu toate acestea, informațiile privind efectele asupra sănătății oamenilor care ar fi trebuit să figureze pe etichetă sunt transmise utilizatorului profesional de către persoana responsabilă cu introducerea pe piață a substanței, în

formatul prevăzut la articolul 27 din directivă. În ceea ce privește consumatorii, li se transmit suficiente informații pentru a le da posibilitatea să ia toate măsurile necesare pentru sănătate și siguranță, așa cum se prevede la articolul 1 alineatul (3) din Directiva 91/155/CEE, astfel cum a fost modificată prin Directiva 93/112/CEE.

8.3. **Metale sub formă solidă**

Aceste substanțe sunt clasificate în anexa I sau urmează să fie clasificate în conformitate cu articolul 6. Cu toate acestea, unele din aceste substanțe, deși sunt clasificate în conformitate cu articolul 2, nu prezintă, în forma comercializată, pericol pentru sănătatea oamenilor în caz de inhalare, ingestie ori în contact cu pielea sau pentru mediul acvatic. Aceste substanțe nu necesită etichetă în temeiul articolului 23. Cu toate acestea, toate informațiile care ar fi trebuit să figureze pe etichetă sunt transmise utilizatorului de către persoana responsabilă cu introducerea pe piață a metalului, în formatul prevăzut la articolul 27.

8.4. **Substanțe clasificate cu R65**

Substanțele clasificate ca nocive din cauza pericolului în caz de aspirare nu este necesar să fie etichetate ca nocive cu fraza R65, dacă sunt introduse pe piață ca aerosoli sau în recipiente prevăzute cu dispozitiv de pulverizare sigilat.

9. CAZURI SPECIALE: Preparate

9.1. **Preparate gazoase (amestecuri de gaze)**

Pentru preparatele gazoase se iau în considerare:

— evaluarea proprietăților fizico-chimice,

— evaluarea pericolelor pentru sănătate,

— evaluarea pericolelor pentru mediu.

9.1.1. Evaluarea proprietăților fizico-chimice

9.1.1.1. *Inflamabilitatea*

Inflamabilitatea acestor preparate se determină în conformitate cu articolul 5 din Directiva 1999/45/CE, după metodele specificate în anexa V partea A din prezenta directivă.

Aceste preparate se clasifică în funcție de rezultatele testelor efectuate și după criteriile din anexa V și criteriile din ghidul de etichetare.

Cu toate acestea, prin derogare, în cazul în care preparatele gazoase sunt produse la comandă, în cantități mici, inflamabilitatea acestor amestecuri gazoase poate fi evaluată prin metoda de calcul următoare:

expresia amestecului de gaze

$$A_1 F_1 + \ldots + A_i F_i + \ldots + A_n F_n + B_1 I_1 + \ldots + B_i I_i + \ldots + B_p I_p,$$

unde: A_i și B_i sunt fracții molare

F_i este un gaz inflamabil

I_i este un gaz inert

n este numărul de gaze inflamabile

p este numărul de gaze inerte,

poate fi transformată într-o formă în care toate I_i (gaze inerte) sunt exprimate în echivalent-azot, folosind un coeficient K_i, și în care conținutul echivalent de gaze inflamabile A'_i se exprimă după cum urmează:

$$A'_i = A_i \times [100 / (A_i + K_i B_i)]$$

Folosind valoarea conținutului maxim de gaze inflamabile care, în amestec cu azotul, dă o compoziție neinflamabilă în aer (Tci), se obține expresia următoare:

$$\Sigma_I A'_i / Tci \leq 1$$

Amestecul de gaze este inflamabil atunci când valoarea frazei de mai sus este mai mare de 1. Preparatul este clasificat ca extrem de inflamabil și este atribuită fraza R12.

Coeficienții de echivalență (K_i)

Valorile coeficienților de echivalență K_i între gazele inerte și azot și valorile conținutului maxim de gaze inflamabile (Tci) figurează în tabelele 1 și 2 ale standardului ISO 10156, ediția din 15.12.1990 (noua ediție: 1996), referitoare la „Gaze și amestecuri de gaze - Stabilirea potențialului de inflamabilitate și de oxidare pentru alegerea armăturilor de ieșire ale robinetelor".

Conținutul maxim de gaze inflamabile (Tci)

Valoarea conținutului maxim de gaze inflamabile (Tci) figurează în tabelul 2 al standardului ISO 10156, ediția din 15.12.1990 (noua ediție: 1996), referitoare la „Gaze și amestecuri de gaze - Stabilirea potențialului de inflamabilitate și de oxidare pentru alegerea armăturilor de ieșire ale robinetelor".

Atunci când valoarea Tci a unui gaz inflamabil nu figurează în standardul menționat anterior, se folosește limita inferioară de explozie (LIE) corespunzătoare. Dacă nu există nici o valoare LIE, valoarea Tci se stabilește la 1 % vol.

Observații:

– expresia de mai sus poate fi folosită pentru a permite o etichetare corespunzătoare a preparatelor gazoase; totuși, ea nu trebuie considerată ca metodă de înlocuire a experimentelor în vederea determinării parametrilor tehnici de siguranță;

– în plus, această expresie nu furnizează nici o informație asupra posibilității de a prepara sau nu, în deplină siguranță, un amestec conținând gaze oxidante. Aceste gaze oxidante nu se iau în considerare la estimarea inflamabilității;

– expresia de mai sus nu dă rezultate fiabile decât dacă gazele inflamabile nu se influențează reciproc din punct de vedere al inflamabilității. Acest aspect trebuie luat în considerare, de exemplu în cazul hidrocarburilor halogenate.

9.1.1.2. *Proprietățile oxidante*

Având în vedere că anexa V la prezenta directivă nu conține o metodă de determinare a proprietăților oxidante ale amestecurilor gazoase, evaluarea acestor proprietăți trebuie efectuată în conformitate cu metoda de estimare următoare.

Principiul metodei este comparația dintre potențialul oxidant al gazelor într-un amestec și potențialul oxidant al oxigenului în aer. Concentrațiile gazelor în amestec se exprimă în % vol.

Se consideră că amestecul de gaze este la fel de oxidant sau mai oxidant decât aerul, dacă este îndeplinită condiția:

$$\Sigma_i x_i C_i \geq 21$$

unde: x_i este concentrația gazului *i*, %vol,

C_i este coeficientul de echivalență în oxigen.

În acest caz, preparatul este clasificat ca oxidant și i se atribuie fraza R8.

Coeficienții de echivalență între gazele oxidante și oxigen

Coeficienții folosiți în calculul de determinare a capacității oxidante a anumitor gaze într-un amestec comparativ cu capacitatea oxidantă a oxigenului în aer, menționați la punctul 5.2 din standardul ISO 10156 ediția 15.12.1990 (noua ediție: 1996) referitoare la „Gaze și amestecuri de gaze - Stabilirea potențialului de inflamabilitate și oxidare la alegerea armăturilor de ieșire ale robinetelor", sunt următorii:

O_2	1
N_2O	0,6

Când în standardul menționat nu există valoare pentru coeficientul C_i al unui gaz, acestui coeficient i se atribuie valoarea 40.

9.1.2. Etichetarea

Pentru recipientele de gaze portabile se consideră că prescripțiile referitoare la etichetare sunt conforme atunci când sunt în conformitate cu articolul 11 alineatul (6) litera (b) din Directiva 1999/45/CE.

Cu toate acestea, prin derogare de la articolul 11 alineatele (1) și (2), pentru recipientele de gaze cu o capacitate normală mai mică sau egală cu 150 l, formatul și dimensiunile etichetei pot respecta prescripțiile standardului ISO 7225 (ediția 1994) referitoare la „Butelii de gaz - Etichete de risc". În acest caz, eticheta poate indica denumirea generică sau denumirea industrială/comercială a preparatului, cu condiția ca denumirile substanțelor periculoase care intră în compoziția sa să figureze clar și în tipăritură de neșters pe corpul recipientului de gaz.

Informațiile specificate la articolul 10 pot fi furnizate pe un disc sau pe o etichetă rezistentă cu fixare permanentă pe recipiente.

9.2. **Recipiente de gaze pentru preparate odorizante care conțin propan, butan sau gaz petrolier lichefiat (GPL)**

Propanul, butanul și gazele petroliere lichefiate sunt clasificate în anexa I. Deși preparatele care conțin aceste substanțe sunt clasificate în conformitate cu articolele 5, 6 și 7 din Directiva 1999/45/CE, ele nu prezintă pericol pentru sănătatea oamenilor atunci când sunt introduse pe piață în butelii închise reîncărcabile sau în cartușe nereîncărcabile din sfera de aplicare a EN 417, ca gaze combustibile care urmează să fie eliberate din recipient numai în vederea combustiei (EN 417, ediția septembrie 1992 referitoare la „Cartușe metalice nereîncărcabile pentru gaze petroliere lichefiate, cu sau fără ventil, destinate alimentării aparatelor portabile: execuție, verificare, testare și marcare").

Aceste butelii și cartușe trebuie etichetate cu simbolul corespunzător și frazele R și S privind inflamabilitatea. Pe etichetă nu este necesară nici o informație referitoare la efectele asupra sănătății oamenilor. Cu toate acestea, informațiile care ar fi trebuit să figureze pe etichetă privind efectele asupra sănătății oamenilor sunt transmise utilizatorului profesional de către persoana responsabilă cu introducerea pe piață a substanței, în formatul prevăzut la articolul 14 din Directiva 1999/45/CE. În ceea ce privește consumatorii, li se transmit suficiente informații pentru a le da posibilitatea să ia toate măsurile necesare pentru sănătate și siguranță, așa cum se prevede la articolul 1 alineatul (3) din Directiva 91/155/CEE.

9.3. **Aliaje, preparate ce conțin polimeri, preparate ce conțin elastomeri**

Aceste preparate sunt clasificate în conformitate cu dispozițiile articolelor 5, 6 și 7 și etichetate în conformitate cu dispozițiile articolului 10 din Directiva 1999/45/CE.

Cu toate acestea, unele din aceste preparate, deși sunt clasificate în conformitate cu articolele 6 și 7, nu prezintă, în forma comercializată, pericol pentru sănătatea oamenilor în caz de inhalare, ingestie ori în contact cu pielea sau pentru mediul acvatic. Aceste preparate nu necesită etichetă în temeiul articolului 10 sau al anexei V B.9. Cu toate acestea, toate informațiile care ar fi trebuit să figureze pe etichetă sunt transmise utilizatorului profesional printr-un sistem de informații într-un format prevăzut la articolul 14 din directiva menționată.

9.4. **Preparate clasificate cu R65**

Preparatele clasificate ca nocive din cauza pericolului în caz de aspirare nu este necesar să fie etichetate ca nocive cu fraza R65, dacă sunt introduse pe piață sub formă de aerosoli sau în recipiente prevăzute cu dispozitiv de pulverizare sigilat.

9.5. **Peroxizi organici**

Peroxizii organici combină proprietățile unui oxidant și ale unei substanțe combustibile într-o singură moleculă: când un peroxid organic se descompune, partea oxidantă a moleculei reacționează exoterm cu partea combustibilă (oxidabilă). În ceea ce privește proprietățile oxidante, metodele menționate în anexa V nu pot fi aplicate la peroxizii organici.

Trebuie folosită metoda de calcul următoare, bazată pe prezența oxigenului activ.

Conținutul disponibil de oxigen (%) al unui preparat de peroxid organic se obține cu formula:

$$16 \times \Sigma \, (n_i \times c_i / m_i),$$

unde:

n_i = numărul grupărilor peroxid pe moleculă de peroxid organic *i*

c_i = concentrația (% gr) peroxidului organic *i*

m_i = masa moleculară a peroxidului organic *i*

9.6. **Dispoziții suplimentare de etichetare pentru anumite preparate**

Pentru anumite preparate există cerințe suplimentare de etichetare stabilite la articolul 10 alineatele (1) și (2) în anexa V la Directiva 1999/45/CE și articolul 20 din Directiva 98/8/CE.

DECLARAȚIA COMISIEI

În privința punctului 4.1.5 și în special în privința ultimului paragraf al punctului 4.1.5, Comisia declară că, în cazul în care ia în considerare aplicarea procedurii de la articolul 28, este pregătită să consulte în prealabil experți desemnați de statele membre și având calificări înalte în materie de efecte cancerigene, mutagene sau toxice asupra reproducerii.

Această consultare va avea loc în cadrul procedurii obișnuite de consultare cu experții naționali și în cadrul comitetelor existente. Tot astfel se va proceda în cazul în care substanțele deja incluse în anexa I trebuie să fie reclasificate în funcție de efectele cancerigene, mutagene sau toxice pentru reproducere.

ANEXA 7A

Pentru produsele intermediare cu expunere la risc limitată se aplică dispozițiile de la punctul 7.

ANEXA 7B

7. **Pachetul de teste redus pentru produsele intermediare în cantități ≥ 1 tonă/an**

1. Definiții

Fără a aduce atingere altor dispoziții legislative comunitare, se aplică următoarele definiții:

— „produsul intermediar" este substanța chimică produsă, consumată sau folosită exclusiv pentru prelucrarea chimică în scopul transformării în altă (alte) substanță (substanțe) chimică (chimice);

— „emisia" se referă la eliberarea unei substanțe dintr-un sistem, de exemplu, atunci când sistemul este deschis. Prin urmare, obiectivul principal trebuie să fie garantarea nivelului maxim de protecție a lucrătorilor și reducerea la minim a emisiilor în mediu prin limitarea riguroasă a procesului;

— „expunerea la risc" se referă la ceea ce se întâmplă după emisia substanței, fie că aceasta a fost emisă în spațiu deschis, fie că substanța poate să fie inhalată de lucrători sau să intre în contact cu pielea acestora. Dacă se anticipează că pot să apară emisii, trebuie efectuat un control riguros al expunerii la risc, cu tehnici adecvate, luând în considerare necesitatea de a adopta principiul de precauție conform căruia acele proprietăți fizico-chimice, toxicologice și ecotoxicologice care nu au fost testate se presupune că sunt periculoase;

— „sistemul integrat de ventilație prin aspirație" este un sistem de ventilație prin aspirație de tip închis, care este folosit în combinație cu dispozitive de blocare, incinte, mantale, containere, în vederea reținerii agenților chimici în partea internă a instalației de tip închis. Deschizăturile din construcție care au legătură cu procesul tehnologic trebuie să fie cât mai mici posibil. Capacitatea de extragere și sistemul de evacuare a aerului trebuie să fie proiectate așa încât depresiunea din instalația de aspirație să fie suficientă pentru a capta și a îndepărta integral toate gazele, vaporii și pulberile care apar. Trebuie să fie prevenit refluxul în zona de lucru al substanțelor periculoase aspirate. Aceasta înseamnă că substanțele periculoase sunt împiedicate să treacă din instalația de tip închis în zona de lucru;

— „sistemul de ventilație prin aspirație cu o înaltă eficiență" este un sistem de ventilație prin aspirație de tip deschis sau semideschis, dimensionat astfel încât agenții chimici să rămână în zona de captare. Aceasta înseamnă că apariția agenților chimici în atmosfera zonei de lucru poate fi practic exclusă;

— „sistemul eficient de ventilație prin aspirație" este un sistem de ventilație prin aspirație de tip deschis sau semideschis, dimensionat astfel încât agenții chimici să rămână în zona de captare, adică apariția agenților chimici în atmosfera zonei de lucru poate fi în mare măsură exclusă sau se poate demonstra respectarea valorii limită;

— „alt sistem de ventilație prin aspirație" este un sistem de ventilație prin aspirație de tip deschis sau semideschis, dimensionat astfel încât apariția agenților chimici în atmosfera zonei de lucru nu poate fi exclusă;

— „formele de folosire care generează emisii reduse" sunt, de exemplu:

  — ambalarea expandabilă, adică substanța periculoasă este închisă într-un ambalaj corespunzător și, fără a deschide ambalajul, se introduce în sistemul de reacție împreună cu ambalajul;

  — schimbarea consistenței, adică substanța este folosită, de exemplu, sub formă de pastă sau de granule în loc de forma pulverulentă;

  — master batch ; aceasta constă în acoperirea substanței periculoase cu o matriță plastică prin care se împiedică orice contact direct cu substanța periculoasă. Matrița plastică în sine nu este o substanță periculoasă. Este posibilă însă abrazarea matricei plastice și, prin urmare, eliberarea substanței periculoase;

— „formele de folosire fără emisii" sunt, de exemplu, master batch fără abraziune, adică matrița plastică este atât de rezistentă la abraziune încât nu se eliberează nici o substanță periculoasă;

— „etanș din punct de vedere tehnic” este termenul care se aplică unui subansamblu dacă nu este depistată nici o neetanșeitate în timpul probelor, controalelor sau verificărilor de etanșeitate, de exemplu, folosind agenți de spumare sau echipamente indicatoare de scurgere, efectuate în acest scop. Sistemele, subsistemele și elementele funcționale sunt etanșe din punct de vedere tehnic dacă pierderea de presiune este < 0,00001 mbar*l*s^{-1}.

2. Cererea privind pachetul de teste redus

Pentru produsele intermediare, notificatorul poate solicita autorității competente permisiunea de a efectua pachetul de teste redus (PTR). Acest PTR reprezintă setul minim de date destinat să conducă la o primă evaluare preliminară a riscurilor privitoare la orice produs intermediar care urmează să fie introdus pe piață. În conformitate cu articolul 16 alineatul (1), poate fi cerut orice test suplimentar, în funcție de rezultatul evaluării de risc.

3. Condițiile pentru cererea privind pachetul de teste redus

Notificatorul trebuie să demonstreze în mod satisfăcător autorității competente căreia îi notifică substanța că sunt îndeplinite următoarele condiții:

(a) substanța este produsă, consumată sau folosită exclusiv pentru prelucrare chimică. Se exclud monomerii. După prelucrare, substanța se transformă în molecule chimic diferite, care nu sunt polimeri;

(b) prelucrarea substanței este restricționată la un număr de maximum două puncte de lucru. De exemplu, aceasta poate fi produsă de o întreprindere și apoi transportată către una sau două alte întreprinderi. De observat că dacă substanța urmează să ajungă în mai mult de două puncte de prelucrare, condițiile de PTR nu mai sunt îndeplinite și dosarul trebuie actualizat până la nivelul corespunzător;

(c) aprovizionarea întreprinderii care folosește produsul intermediar în scop de prelucrare avansată trebuie să se facă direct de la notificator și nu printr-un furnizor intermediar;

(d) substanța trebuie să fie izolată riguros prin mijloace tehnice pe durata întregului ciclu de viață. Aici se includ producția, transportul, purificarea, curățarea și întreținerea utilajelor, prelevarea probelor, analiza, încărcarea și descărcarea echipamentului/recipientelor, îndepărtarea/purificarea deșeurilor și depozitarea. În general, într-un proces adecvat toate elementele funcționale ale instalației, cum sunt gurile de umplere, echipamentele de golire etc. sunt fie de tip închis cu etanșeitate garantată, fie de tip închis cu sistem integrat de ventilație prin aspirație;

(e) atunci când există potențial de expunere la risc, trebuie folosite acele tehnologii de operare și control care reduc la minimum emisiile și, în consecință, expunerea la risc;

(f) în cazul lucrărilor de curățare și întreținere, trebuie aplicate metode speciale, cum sunt purjarea și spălarea, înainte ca sistemul să fie deschis sau să se pătrundă înăuntru;

(g) operațiunile de transport respectă cerințele Directivei 94/55/CE a Consiliului astfel cum a fost modificată;

(h) în caz de accident și atunci când se generează deșeuri în urma operațiunilor de purificare sau de curățare și întreținere, poate fi expus mediul. În oricare din cazuri se folosesc acele tehnologii de operare și de control care reduc la minimum emisiile și, în consecință, expunerea la risc;

(i) trebuie să existe un sistem de gestionare care identifică rolurile fiecărei persoane în organizație;

(j) ambalajul substanței se etichetează în conformitate cu anexa VI la Directiva 67/548/CEE și, în plus, cu propoziția următoare „Atenție - substanță netestată complet”;

(k) notificatorul trebuie să folosească un sistem de supraveghere a produsului și trebuie să supravegheze utilizatorii (maximum doi) așa încât să asigure respectarea condițiilor enumerate anterior.

4. Dosarul tehnic prezentat pentru pachetul de teste redus

Notificatorul care solicită un PTR pentru o substanță trebuie să prezinte autorității competente următorul dosar tehnic pentru toate punctele de producție și de prelucrare:

(a) o declarație conform căreia notificatorul și fiecare utilizator acceptă condițiile enumerate la punctul 3;

(b) descrierea măsurilor tehnice prin care se realizează izolarea riguroasă a substanței ([1]), inclusiv metodele de umplere, de prelevare a probelor, de transfer și de curățare. Nu este necesar să fie furnizate detalii privind integritatea fiecărui racord sau eficiența sistemului integrat de ventilație prin aspirație. Cu toate acestea, oricare ar fi mijloacele prin care se asigură izolarea riguroasă a procesului, este important ca informația să fie disponibilă, dacă este necesar, pentru a verifica veridicitatea afirmațiilor făcute în cazul unui control;

(c) dacă nu sunt îndeplinite criteriile de evaluare a sistemelor închise la manipularea agenților chimici, detaliate la punctul 5 de mai jos, notificatorul trebuie să prezinte informații privind expunerea la risc bazate pe verificări reprezentative și pe un model de calcul fiabil, pentru a da posibilitatea autorității competente să decidă dacă acceptă sau nu PTR solicitat;

(d) descrierea detaliată a proceselor în toate punctele de lucru implicând producția și prelucrarea. În special, trebuie specificat dacă deșeurile de producție și prelucrare sunt evacuate în apele reziduale, deșeurile lichide sau solide sunt incinerate și cum se face curățarea și întreținerea întregului echipament;

(e) o evaluare detaliată a emisiilor posibile și a expunerii la risc pentru om și mediu pe durata întregului ciclu de viață, inclusiv detalii referitoare la diferitele reacții chimice implicate în proces și la modul de tratare a reziduurilor. Acolo unde emisiile conduc la expuneri la risc, mijloacele prin care sunt controlate acestea trebuie descrise suficient de detaliat pentru a da posibilitatea autorității competente să decidă dacă acceptă sau nu declarația sau să calculeze o rată a emisiilor în conformitate cu Ghidul Tehnic al UE;

(f) schimbările care pot afecta expunerea la risc a omului și a mediului trebuie notificate anticipat, de exemplu orice schimbare la elementele funcționale ale instalației, un nou utilizator sau un nou punct de lucru;

(g) informațiile prescrise pentru PTR sunt următoarele:

anexa VII.B plus următoarele teste din prezenta anexă:

— presiunea de vapori (3.4),

— proprietățile explozive (3.11),

— temperatura de autoaprindere (3.12),

— proprietățile oxidante (3.13),

— granulometria (3.15),

— toxicitatea acută pentru dafnia (5.1.2).

Notificatorul trebuie să includă și alte informații relevante care să îi dea posibilitatea autorității competente să ia o decizie informată și să facă posibilă efectuarea unor controale adecvate de către utilizator la punctul de prelucrare. De exemplu, dacă sunt disponibile suplimentar informații fizico-chimice, toxicologice și despre comportamentul în mediu, acestea trebuie prezentate și ele. În plus, notificatorul trebuie să examineze informațiile disponibile privind toxicitatea și ecotoxicitatea substanțelor aflate în strânsă relație structurală cu substanța notificată. Dacă sunt disponibile date relevante, în special referitoare la toxicitatea cronică sau reproductivă și la cancerogeneză, trebuie prezentat și un rezumat al acestor informații;

(h) identitatea notificatorului, a producătorului și a utilizatorului (utilizatorilor).

([1]) Tipul de construcție și specificațiile tehnice (de exemplu, etanșeitatea) elementelor funcționale închise determină eficiența izolării. Pentru a da posibilitatea autorității competente să decidă dacă se realizează sau nu izolarea riguroasă, este esențial ca notificatorul să includă detalii referitoare la aceste aspecte. Măsurile tehnice trebuie, în mod normal, să îndeplinească condițiile din „Criterii de evaluare a sistemelor închise la manipularea agenților chimici" care sunt incluse, orientativ, la punctul 7.5 și în tabelul 1 din prezenta anexă. Cele de mai sus sunt declarate de notificator, nefiind totuși necesar ca, în descrierea privitoare la măsurile tehnice, acesta să se refere la fiecare tip de element funcțional închis. Orice abatere de la condițiile fixate în criterii trebuie descrisă detaliat, cu justificare.

5. Criterii de evaluare a sistemelor închise la manipularea agenților chimici

5.1. *Folosirea*

La evaluarea instalației se folosește un indice de evaluare. Indicele de evaluare clasifică manipularea substanței și potențialul rezultant de expunere la risc legată de proces. Pentru determinarea indicelui de evaluare, notificatorul examinează instalația sau sectorul de instalație în cauză. Fiecare element funcțional individual trebuie evaluat.

Sistemele se consideră ca fiind închise dacă evaluarea tuturor elementelor funcționale disponibile corespunde indicelui de evaluare 0,5 și dacă sunt implicate numai elemente funcționale care sunt de tip închis cu etanșeitate garantată și echipate cu sistem integrat de ventilație prin aspirație. În plus, trebuie exclus contactul direct cu pielea.

În colecția de exemple, elementele funcționale relevante sunt indicate cu 0,5 în aldine.

Elementele funcționale de tip parțial deschis cu ventilație prin aspirație având o eficiență ridicată (indicate de asemenea de indicele de evaluare 0,5, dar în corp de literă obișnuit) nu sunt considerate închise în sensul acestei norme.

Atunci când elementelor funcționale li s-a acordat indicele de evaluare 1, înseamnă că respectarea certă și permanentă a valorii-limită nu este întotdeauna asigurată. Astfel de elemente funcționale sunt:

1 — tip închis, etanșeitate negarantată

1 — tip parțial deschis cu ventilație prin aspirație eficientă

Atunci când elementelor funcționale li s-au acordat indicii de evaluare 2 și 4, înseamnă că respectarea valorilor limită nu este întotdeauna asigurată. Astfel de elemente funcționale sunt:

2 — de tip parțial deschis, cu sistem simplu de ventilație prin aspirație și deschidere neasigurată

2 — deschis cu sistem simplu de ventilație prin aspirație

4 — de tip deschis sau de tip parțial deschis

4 — ventilație naturală.

Catalogul exemplelor din tabelul 1 facilitează clasificarea elementelor funcționale. Elementele funcționale care nu sunt incluse în colecția de exemple pot fi clasificate în temeiul analogiilor. Instalația sau sectorul de instalație este apoi clasificat(ă) folosind valoarea indicelui acelui element funcțional care a primit cel mai ridicat indice de evaluare.

5.2. *Verificarea*

Folosirea acestui criteriu necesită respectarea parametrilor tehnologici stabiliți și efectuarea verificărilor menționate în colecția de exemple (de exemplu, controlul și întreținerea instalațiilor).

6. Aplicarea pachetului de teste redus

Dacă autoritatea competentă acceptă cererea notificatorului pentru un PTR, atunci informațiile din teste și studiile stabilite la punctul 7.4 sunt necesare pentru dosarul tehnic menționat la articolul 7. De observat că pentru cantitățile mai mici de 1 tonă/an se aplică cerințele privind testarea din anexa VII.B/VII.C.

TABELUL 1

Colecția de exemple

Nr.	Element funcțional	Tip constructiv	Exemple de tipuri constructive	Indice de evaluare		Explicații
				Fără	Cu măsuri suplimentare	
1	2	3	4	5	6	7
1	**etanșări statice**					
1.1	**etanșări statice**	racorduri nedemontabile	— sudate	**0,5**		
			— sudate cu lipitură moale	**0,5**		
1.2	**etanșări statice**	racorduri demontabile	— garnitură cu margine sudată	**0,5**		— se reduc racordurile până la numărul necesar — se deschid racordurile cât mai puțin posibil — probe de etanșeitate înainte de reluarea operațiunii — se folosesc dispozitive de etanșare noi în cazul reluării operațiunilor implicând racorduri demontabile — unde este posibil, flanșele destinate să se deschidă din motive tehnologice nu trebuie echipate cu lambă și uluc (pericol de călcătură greșită)
			— racord ≤ DN 32 cu poanson inelar și inel de strângere	**0,5**		
			— pasul filetului ≤ DN 50, Δt ≤ 100 °C	**0,5**		
			— racord > DN 32 cu poanson inelar și inel de strângere	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
			— pasul filetului > DN 50, Δt > 100 °C	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
			— flanșă cu lambă și uluc cu etanșarea corespunzătoare	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
			— flanșă cu prag și adâncitură cu etanșarea corespunzătoare	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
			— flanșă cu șanț în V și etanșarea corespunzătoare în V	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
			— flanșă cu guler cu etanșarea corespunzătoare	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.
   Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
1.3	**etanşări semistatice**					
1.3.1	**armături**	obturatoarele cu tije rotitoare şi nerotitoare ale armăturilor, de ex. pt. robinete cu bilă, robinete cu cep, robinete cu ventil, robinete cu clapă-fluture, robinete cu sertar	— presganituri	2	1 în cazul controlului şi reparaţiilor regulate	
			— presgarnituri cu autoacţionare (cu arc)	1	**0,5 etanş din punct de vedere tehnic**	
			— presgarnitură dublă cu pârghie şi contragreutate	1	0,5 cu controlul sistemului de contragreutate	prin controale vizuale regulate sau echipament de control al proceselor
			— garnitură circulară	1	**0,5 etanş din punct de vedere tehnic**	
			— garnitură de robinet cu cep	1	0,5 asigurarea etanşeităţii prin control şi reparaţii	
			— garnitură de robinet cu sertar tip piston	1	0,5 etanş d.p.d.v. tehnic	
			— manşon deformabil	**0,5**		
			— diafragmă (membrană)	**0,5**		
			— cuplaj magnetic	**0,5**		
1.3.2	**altele**	tije de reglare	— presgarnituri	2	1 în caz de control şi reparaţii regulate	
			— presgarnituri cu autoacţionare (cu arc)	1	**0,5 etanş din punct de vedere tehnic**	
			— presetupă dublă cu pârghie şi contragreutate	1	**0,5 cu controlul sistemului de contragreutate**	prin controale vizuale regulate sau echipament de control al proceselor
			— garnitură circulară	1		
			— etanşare pt. robinet cu sertar tip piston	1		
			— manşon deformabil	**0,5**		
			— diafragmă (membrană)	**0,5**		
2.	**etanşări dinamice**					
2.1	**etanşări cu piese în rotaţie**	închis ermetic	— motor cu colivie	**0,5**		
			— cuplaje magnetice	**0,5**		
		etanşări cu contact	— garnitură monoaxială	1		
			— garnitură biaxială	1		

1	2	3	4	5	6	7
			— garnitură biaxială cu film fluid	1	**0,5 cu controlul sistemului de presiune a fluidului prin verificări regulate, în mod obișnuit o dată/zi sau, de exemplu, echipament cu alarmă de control al procesului**	
			— presgarnitură	2	1 în cazul controlului și reparațiilor regulate	
			— presgarnitură cu autoacționare (cu arc)	2	**0,5 etanș din punct de vedere tehnic**	
		etanșări fără contact	— garnitură zimțată	2		
			— garnitură cu ungere uscată	1	**0,5 cu controlul debitului de gaz**	
2.2	**etanșări pentru piese în oscilație**	— etanșare cu manșon deformabil	— robinete cu manșon deformabil	**0,5**		
			— pompe alternative cu etanșare cu manșon deformabil	**0,5**		
		— etanșări cu membrană	— pompe cu membrană	**0,5**		
			— robinete cu membrană conice	**0,5**		
		— învelișuri	— pompe alternative	1		
			— segment raclor	1		
3.	**transferul substanței și gurile de umplere**					
3.1	**pentru substanțe solide**					
3.1.1	**saci**					
3.1.1.1	**saci** (golire)	gură de vizitare deschisă, recipient deschis	— golire manuală	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	dacă este prezentă o substanță periculoasă în recipient, situației i se acordă atenția cuvenită
					1 cu sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	

1	2	3	4	5	6	7
		mașină de tăiat și golit saci			0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	
		mașină de tăiat și golit saci încapsulată, cu sistem integrat de ventilație prin aspirație		1	**0,5 comprimarea și împachetarea sacilor goi în interiorul zonei încapsulate, asigurarea etanșeității prin control și reparații**	
3.1.1.2.	**saci** (umplere)	umplere manuală, umplere în spațiu deschis	— umplere manuală	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 cu sistem eficient de ventilație prin aspirație 1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă 0,5 cu sistem de ventilație prin aspirație foarte eficient 0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	
		echipament de umplere a sacilor	mașină de însăcuit cu ventil, de ex. mașină de ambalat pneumatică, mașină de ambalat elicoidală, mașină de ambalat cu cântar	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 cu sistem eficient de ventilație prin aspirație 0,5 sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
			— mașina de ambalat de vid	2	1 cu sistem eficient de ventilație prin aspirație 0,5 sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
			— mașină de însăcuit complet încapsulată cu sistem integrat de ventilație prin aspirație	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
			— mașină de ștanțat, umplut și sigilat saci	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
3.1.2	**saci mari, recipiente cu produse intermediare vrac**					

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.
   Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
3.1.2.1	**saci mari, recipiente cu produse intermediare vrac** (golire)	gură de vizitare deschisă	— golire manuală	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 sistem eficient de ventilație prin aspirație 1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă 0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație 0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	
		echipament de golire a sacilor mari		4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 sistem eficient de ventilație prin aspirație 1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă 0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație 0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	
3.1.2.2	**saci mari, recipiente cu produse intermediare vrac** (umplere)	umplerea sacilor mari în spațiu deschis	— umplere manuală	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 sistem eficient de ventilație prin aspirație 1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă 0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație 0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	
		echipament de umplere a sacilor mari	— umplere a sacilor în spațiu deschis	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 sistem eficient de ventilație prin aspirație 1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă 0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație 0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	

1	2	3	4	5	6	7
		echipament de umplere a sacilor mari	— mașină de însăcuit complet încapsulată, cu sistem integrat de ventilație prin aspirație	1	**0,5 tehnologie cu capete speciale de umplere (de exemplu, cu sigilare laterală) și închiderea sacului fără praf; picurarea ulterioară la capul de umplere este împiedicată, asigurarea etanșeității prin control și reparații**	
			— cântare de saci mari	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 sistem eficient de ventilație prin aspirație 1 formă de folosire cu emisii reduse, nu este prezentă nici o altă substanță periculoasă 0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație 0,5 formă de folosire fără emisii (de exemplu, master batch fără abraziune)	
3.1.3	**recipiente**					
3.1.3.1	**recipiente** (golire)	cu echipament de golire de tip închis		1	**0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat) și există sistem integrat de ventilație prin aspirație, asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*) 0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat) și există sistem integrat de ventilație prin aspirație, asigurarea etanșeității prin control și reparații	izolația capacului recipientului trebuie să respecte condițiile de la 1.2
		recipient deschis		4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație 1 sistem eficient de ventilație prin aspirație 0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.
   Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
3.1.3.2	**recipiente** (umplere)	cu echipament special de umplere		1	**0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat), asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	
		umplere în spațiu deschis		4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație (*)	
3.1.4	**butoaie**	cu echipament de golire	— închise	1	**0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat) și există sistem integrat de ventilație prin aspirație**	
3.1.4.1	**butoaie** (golire)					
			— transport mecanic, de exemplu, cu conveier elicoidal	4	0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat) și există sistem de ventilație prin aspirație sau sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
			— transport pneumatic, de exemplu, cu aer comprimat	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
					2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 cu sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**

   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.

2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**

   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.

   Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
		recipient deschis	— transport mecanic, de exemplu, cu conveier elicoidal	4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
			— transport pneumatic, de exemplu, cu aer comprimat		2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 sistem eficient de ventilație prin aspirație	
				4	0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
3.1.4.2	**butoaie** (umplere)	cu echipament special de umplere		1	**0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat) și există sistem integrat de ventilație prin aspirație**	
		umplere în spațiu deschis		4	0,5 etanșeitatea este asigurată prin măsuri speciale (de exemplu, racord cu autoblocare controlat) și există sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
					2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
3.1.5	**vehicule cu buncăr**					
3.1.5.1	**vehicule cu buncăr** (golire)	conducte fixe, braț articulat		1	0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); captarea completă a cantităților reziduale în timpul manevrelor de cuplare și decuplare	
		racordare prin furtun	— folosire fixă (furtunurile de legătură și racordurile sunt furnizate de întreprindere)	1	0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); captarea completă a resturilor de substanță în timpul manevrelor de cuplare și decuplare	

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.
   Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
			— alte moduri de folosire (furtunurile de legătură și racordurile sunt furnizate de întreprindere)	2	1 captarea completă a resturilor de substanță	
3.1.5.2	**vehicole cu buncăr** (umplere)	conducte fixe, braț articulat		1	0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); captarea completă a resturilor de substanță în timpul manevrelor de cuplare și decuplare	
		racordare prin furtun	— folosire fixă (furtunurile de legătură și racordurile sunt furnizate de întreprindere)	1	0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); captarea completă a resturilor de substanță în timpul manevrelor de cuplare și decuplare	
			— alte moduri de folosire (furtunurile de legătură și racordurile sunt furnizate de întreprindere)	2	1 captarea completă a resturilor de substanță	
3.1.6	**armături de admisie și evacuare**	pentru buncăre, echipamente de umplere, recipiente cu material vrac	— robinete cu clapă-fluture	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); curățat cu regularitate**	
			— robinete cu cep de trecere și de oprire	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); curățat cu regularitate**	
			— robinete cu sertar plat	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); curățat cu regularitate**	
			— placa robinetului cu sertar	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); curățat cu regularitate**	
			— robinet de strângere cu garnitură moale	1		
			— robinet cu diafragmă lenticulară	1		
			— robinet cu furtun	1		
3.2	**puncte de transfer al substanțelor - lichide**					
3.2.1	**recipiente și butoaie mici**					

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.
   Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
3.2.1.1	**recipiente și butoaie mici** (golire)	legături fixe (conducte, racorduri cu furtunuri, braț articulat)	— cu împingerea gazului sau cu evacuarea gazului la loc sigur sau transfer către o instalație de tratare sau incinerare	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); probă de etanșeitate după stabilirea legăturii, captarea completă a resturilor de substanță**	pentru elementele de legătură a se vedea 1
			— fără împingerea gazului și fără evacuarea sa la loc sigur	4		
		butoaie cu umplere în spațiu deschis	— cu pompă rotativă sau furtun	4	1 în cazul unei construcții etanșe și fără picurare, echipate cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	verificarea cu regularitate a sistemului de ventilație prin aspirație; recipientele și butoaiele mici trebuie închise imediat după umplere
		golire în instalații închise	— încapsulare	1	**0,5 cu sistem integrat de ventilație prin aspirație și de deschidere și închidere a butoaielor în instalații închise**	verificarea cu regularitate a sistemului de ventilație prin aspirație
3.2.1.2	**recipiente și butoaie mici** (umplere)	legături fixe (conducte, racorduri cu furtunuri, braț articulat)	— cu împingerea gazului sau cu evacuarea gazului la loc sigur sau transfer către o instalație de tratare sau incinerare	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații (*); probă de etanșeitate după stabilirea legăturii, captarea completă a resturilor de substanță**	pentru elementele de legătură a se vedea 1
			— fără împingerea gazului și fără evacuarea sa la loc sigur	4	1 în cazul unei construcții etanșe și fără picurare, echipate cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
		butoaie cu umplere în spațiu deschis	— cu furtun de alimentare	4	0,5 în cazul unei construcții etanșe și fără picurare, echipate cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	verificarea cu regularitate a sistemului de ventilație prin aspirație; recipientele și butoaiele mici trebuie închise imediat după umplere
			— încapsulare	1	**0,5 cu sistem integrat de ventilație prin aspirație și de deschidere și închidere a butoaielor în instalații închise**	verificarea cu regularitate a sistemului de ventilație prin aspirație

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul de reparație necesară, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.

1	2	3	4	5	6	7
3.2.2	**cisterne, vagoane-cisternă, containere**					
3.2.2.1	**cisterne, vagoane-cisternă, containere** (golire)	legături fixe, de exemplu conducte fixe, racorduri cu furtun, braţe de încărcare din oţel	— cu împingerea gazului sau cu evacuarea gazului la loc sigur sau transfer către o instalaţie de tratare sau incinerare	**1**	**0,5 asigurarea etanşeităţii prin control şi reparaţii (*) ; probă de etanşeitate după stabilirea legăturii, captarea completă a resturilor de substanţă**	pentru elementele de legătură vezi 1.
			— fără împingerea gazului şi fără evacuarea sa	**4**		
		alte racorduri cu furtun		**2**	1 captarea completă a resturilor de substanţă	
3.2.2.2	**cisterne, vagoane-cisternă, containere** (umplere)	legături fixe, de exemplu conducte fixe, racorduri cu furtun, braţe de încărcare din oţel	— cu împingerea gazului sau cu evacuarea gazului la loc sigur sau transfer către o instalaţie de tratare sau incinerare	**1**	0,5 asigurarea etanşeităţii prin control şi reparaţii ; probă de etanşeitate după stabilirea legăturii, captarea completă a resturilor de substanţă	containerele trebuie închise imediat după umplere
			— fără împingerea gazului şi fără evacuarea sa	**4**		
		umplere în spaţiu deschis	— conductă de alimentare	**4**	1 cu sistem foarte eficient de ventilaţie prin aspiraţie, captarea completă a resturilor de substanţă	containerele trebuie închise imediat după umplere
3.3	**puncte de transfer al substanţelor - gaze**					cu privire la elementele funcţionale a se vedea 1
3.3.1	**gaze** (umplere şi golire)			**1**	**0,5 asigurarea etanşeităţii prin control şi reparaţii (*); probă de etanşeitate după stabilirea legăturii; împingerea gazelor sau evacuarea gazelor reziduale la un loc sigur sau transferul către o instalaţie de tratare sau incinerare**	sisteme închise, sectoarele de instalaţie şi elementele funcţionale trebuie operate, controlate şi întreţinute astfel încât să rămână etanşe din punct de vedere tehnic în cazul solicitărilor mecanice, chimice şi termice previzibile pentru tipul de operaţie avut în vedere

(*) Etanşeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalaţiei şi componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecţie pentru a determina şi a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar şi în conformitate cu un plan adaptat la necesităţile specifice întreprinderii, tipului de legătură şi construcţie, ca şi naturii şi proprietăţilor agenţilor chimici care sunt circulaţi în instalaţie. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanşeitate,
   — examinarea vizuală a instalaţiei pentru a observa punctele neetanşe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalaţiei cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenţi de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulaţie sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparaţie pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate şi aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanţa periculoasă în cauză,
   — tipul şi extinderea avariei,
   — măsurile de protecţie şi de siguranţă care trebuie luate.
   Înainte de a reporni instalaţia, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanşeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
4	**puncte de prelevare a probelor**					
4.1	**prelevarea probelor în spațiu deschis**		ventil, robinet de închidere	**4**	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
4.2	**prelevarea probelor în spațiu închis**			**1**	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații** (*)	prelevarea probelor trebuie să se facă printr-un sistem de prelevare închis, evitându-se scăpările necontrolate de produs. Prin scăpări necontrolate se înțelege: — stropirea cu lichid la prelevarea probelor dintr-un utilaj sub presiune — scurgerile de lichid pe la racordurile tuburilor din punctul de probă — scăpări de vapori de produs — deversarea din recipientele de probă supraîncărcate
5	**depozitarea în butoaie**					
5.1	**substanțe solide, cu excepția anumitor explozivi**	ambalare în scop de transport în conformitate cu normele ADR	— butoaie, recipiente	**0,5**		cu ventilație suficientă (min. înlocuirea de două ori a aerului din încăpere pe parcursul operațiunii)
			— saci mari; saci de plastic, textili, de hârtie și multistrat	0,5		cu ventilație suficientă (min. înlocuirea de două ori a aerului din încăpere pe parcursul operațiunii)
5.2	**substanțe solide, anumiți explozivi (conținând nitroglicerină)**	ambalare în scop de transport în conformitate cu normele ADR		4	2 cu alt sistem de ventilație prin aspirație	
					1 sistem eficient de ventilație prin aspirație	
					0,5 cu sistem foarte eficient de ventilație prin aspirație	
5.3	**lichide**	ambalare în scop de transport în conformitate cu normele ADR	— recipiente, butoaie metalice, canistre de tablă, butoaie, cutii circulare, canistre, recipiente de plastic	0,5		cu ventilație suficientă (min. înlocuirea de două ori a aerului din încăpere pe parcursul operațiunii)

(*) Etanșeitatea racordurilor separabile între sectoarele instalației și componentele echipamentului poate fi asigurată prin luarea următoarelor măsuri pe baze permanente:

1. **Măsuri de control sau inspecție pentru a determina și a evalua starea curentă a racordurilor demontabile, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Acestea trebuie aplicate după un calendar și în conformitate cu un plan adaptat la necesitățile specifice întreprinderii, tipului de legătură și construcție, ca și naturii și proprietăților agenților chimici care sunt circulați în instalație. Exemple de astfel de măsuri sunt:
   — proba de etanșeitate,
   — examinarea vizuală a instalației pentru a observa punctele neetanșe în mod evident, cum sunt locurile în care picură lichid, examinarea pentru a observa dâre, mirosuri, zgomote, formarea brumelor etc.,
   — inspectarea instalației cu indicatoare mobile de scurgeri (de exemplu, analizoare de gaz, FID, detectoare portabile de gaze),
   — aplicarea de agenți de spumare la racordurile separabile,
   — folosirea detectoarelor de gaze pentru monitorizarea atmosferei,
   — folosirea unui indicator de scurgeri automat la furtunurile cu articulație sau la furtunurile de alimentare.
2. **Măsuri de reparație pentru readucerea racordurilor separabile în starea dorită, în conformitate cu EN 13306 (în pregătire):**
   Măsurile care este posibil să fie cerute trebuie planificate și aplicate în mod individual, având în vedere:
   — substanța periculoasă în cauză,
   — tipul și extinderea avariei,
   — măsurile de protecție și de siguranță care trebuie luate.

Înainte de a reporni instalația, racordurile reparate trebuie să fie supuse unei probe de etanșeitate complexe.

1	2	3	4	5	6	7
5.4	**gaze**	ambalare în scop de transport în conformitate cu normele ADR	— cilindri cu gaz sub presiune — recipiente cu gaz sub presiune — butelii cu gaz sub presiune	1	**0,5 asigurarea etanșeității prin control și reparații**	cu ventilație suficientă (min. înlocuirea de două ori a aerului din încăpere pe parcursul operațiunii); cu privire la elementele funcționale a se vedea 1; sisteme închise, sectoarele de instalație și elementele funcționale trebuie operate, controlate și întreținute astfel încât să rămână etanșe din punct de vedere tehnic în cazul solicitărilor mecanice, chimice și termice previzibile pentru tipul de operație avut în vedere

ANEXA 8A

Atunci când, în conformitate cu dispozițiile din anexa VII.A referitoare la produsele intermediare, autoritatea competentă pertinentă a autorizat aplicarea pachetului de teste redus unei substanțe chimice, cerințele acestei secțiuni se reduc după cum urmează:

— atunci când cantitatea de substanță introdusă pe piață ajunge la 10 t/an/producător sau atunci când cantitatea totală introdusă pe piață ajunge la 50 t/producător; în acest caz autoritatea competentă pertinentă cere toate testele și studiile stabilite la punctele 3-6 din anexa VII.A (cu excepția celor deja efectuate); în plus, autoritatea competentă pertinentă poate cere acele teste și studii de nivelul 1 care privesc organismele acvatice;

— atunci când cantitatea de substanță introdusă pe piață ajunge la 100 t/an/producător sau atunci când cantitatea totală introdusă pe piață ajunge la 500 t/producător; în acest caz autoritatea competentă pertinentă cere testele și studiile de nivelul 1 care privesc toxicitatea reproductivă. Autoritatea competentă pertinentă poate decide că prin clasificarea substanței ca produs intermediar făcând obiectul unui PTR există un motiv suficient pentru ca unul sau mai multe teste și studii, cu excepția celor privind toxicitatea reproductivă, să nu fie adecvate.

ANEXA 8B

Atunci când cantitatea de substanță introdusă pe piață ajunge la 1 000 t/an/producător sau atunci când cantitatea totală introdusă pe piață ajunge la 5 000 t/producător, în mod normal nu se mai cer studiile suplimentare menționate la nivelul 1 sau 2. Autoritatea competentă pertinentă ar trebui totuși să aibă în vedere teste suplimentare și poate cere teste suplimentare, inclusiv testele stabilite la nivelurile 1 și 2 ale prezentei OECD, Paris, 1992, Orientarea 210, Peștele, Teste de toxicitate în stadiile de viață timpurii.