

I. Disposiciones generales

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

16039 *ORDEN de 30 de junio de 1998 por la que se modifican los anexos I, III, V y VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.*

El Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas se aprobó por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo. Esta disposición se dictó en base a las normas comunitarias reguladoras de la materia constituidas, fundamentalmente, por la Directiva 92/32/CEE, que modifica por séptima vez la Directiva 67/548/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, así como sus posteriores modificaciones y adaptaciones al progreso técnico.

El anexo I del citado Reglamento fue modificado por las Órdenes de 13 de septiembre de 1995 y de 21 de febrero de 1997, con objeto de incorporar a nuestro derecho interno las Directivas de la Comisión 93/101/CEE y 94/69/CE, respectivamente, que adaptaron al progreso técnico el anexo I de la Directiva marco 67/548/CEE.

Posteriormente se ha producido una nueva adaptación al progreso técnico, constituida por la Directiva de la Comisión 96/54/CE, dirigida sustancialmente a la actualización de los anexos I, III, V y VI de la citada Directiva marco 67/548/CEE modificada por séptima vez por la Directiva del Consejo 92/32/CEE.

Se hace pues necesario proceder a la trasposición de la Directiva 96/54/CE al ordenamiento jurídico interno español, lo que se realiza mediante la presente Orden que se dicta en base a la habilitación prevista en la disposición final primera del Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.

En su virtud, oídos los sectores afectados y a propuesta de los Ministros de Sanidad y Consumo y de Industria y Energía, dispongo:

Artículo 1.

El prólogo del anexo I del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, en su redacción dada por la Orden de 21 de febrero de 1997, queda modificado en la siguiente forma:

1. La nota 4 se sustituye por el texto siguiente:

«Nota 4. Los preparados que contengan esas sustancias se clasificarán como nocivos, con la fra-

se R-65, si cumplen los criterios del punto 3.2.3 del anexo VI del presente Reglamento.»

2. Se añade una nueva nota 5 con la siguiente redacción:

«Nota 5. Los límites de concentración para los preparados gaseosos se expresarán como porcentaje de volumen en volumen.»

3. Se añade en la tabla B, la siguiente clasificación especial de sustancias orgánicas: «647 Enzimas».

Artículo 2.

El anexo I del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, queda modificado en la siguiente forma:

1. Se sustituyen las correspondientes entradas por las que aparecen en la parte I del anexo A de la presente Orden.

2. Se adicionan las entradas que aparecen recogidas en la parte II del anexo A de la presente Orden.
3. Se suprimen las entradas que aparecen reflejadas en la parte III del anexo A de la presente Orden.

4. Se modifican las entradas que aparecen relacionadas en la parte IV del anexo A de la presente Orden, sustituyéndose todas las referencias a la frase R-22 que aparece en las mismas, por la referencia a la frase R-65.»

Artículo 3.

Se añade una nueva frase de riesgo al anexo III del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, con la siguiente redacción: «R-65. Nocivo: Si se ingiere puede causar daño pulmonar.»

Artículo 4.

La parte B, del anexo V, del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, queda modificado como sigue:

- «1. El texto que figura en la parte I del anexo B de la presente Orden sustituye al encabezamiento y la introducción general.

2. Después del capítulo B.1.bis, se inserta un nuevo capítulo B.1.ter, cuyo texto figura en la parte II del anexo B.

3. Se sustituye el texto del capítulo B.6, por el que figura en la parte III del anexo B de la presente Orden.

4. Se sustituye el texto del capítulo B.7, por el que figura en la parte IV del anexo B de la presente Orden.

5. Se añaden los nuevos capítulos B.37 y B.38 cuyos textos figuran en la parte V del anexo B de la presente Orden.»

Artículo 5.

Las modificaciones que establece el anexo C de la presente Orden se introducirán en el anexo VI del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y cla-

sificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.

Disposición final única.

La presente Orden entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid 30 de junio de 1998.

ÁLVAREZ-CASCOS FERNÁNDEZ

Excmos. Sres. Ministros de Sanidad y Consumo y de Industria y Energía.

A N E X O A-I

Cas No 630-08-0

EEC No 211-128-3

No 006-001-00-2

Cas No 75-44-5

EEC No 200-870-3

No 006-002-00-8

NOTA B

COCl₂

CO



fosgeno

monóxido de carbono

Clasificación

F +; R 12 Repr. Cat. 1; R 61 T: R 23-48/23

Etiquetado


F+  T 

R: 61-12-23-48/23
S: 33-45

Clasificación

T+; R 26 C; R 34

Etiquetado

T+ 

R: 26-34
S: (1/2)-9-26-36/37/39-45

Límites de concentración

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA 5

| | |
|--------------------|-------------------|
| C ≥ 5 % | T+; R 26-34 |
| 1 % ≤ C < 5 % | T+; R 26-36/37/38 |
| 0,5 % ≤ C < 1 % | T; R 23-36/37/38 |
| 0,2 % ≤ C < 0,5 % | T; R 23 |
| 0,02 % ≤ C < 0,2 % | Xn; R 20 |

Cas No 7664-41-7

EEC No 231-635-3

No 007-001-00-5

Cas No 1336-21-6

EEC No 215-647-6

No 007-001-01-2

NOTA B

NH₃

NH₃ ... %



amoníaco, anhidro

amoníaco ... %

Clasificación

R 10 T, R 23 C, R 34 N, R 50

Etiquetado



T  N 

R: 10-23-34-50
S: (1/2-9-16-26-36/37/39-45-61)

Clasificación

C, R 34 N, R 50

Etiquetado

C  N 

R: 34-50
S: (1/2-26-36/37/39-45-61)

Límites de concentración

| | |
|-----------------|-------------------|
| C ≥ 5 % | T, R 23-34 |
| 0,5 % ≤ C < 5 % | Xn; R 20-36/37/38 |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA 5

Límites de concentración

| | |
|-----------------|----------------|
| C ≥ 25 % | C, N; R 34-50 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 34 |
| 5 % ≤ C < 10 % | Xi; R 36/37/38 |
| | |
| | |
| | |

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

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

No 007 002-00-0

Cas No 7782-44-7

EEC No 231-936-9

No 008-001-00-8

NO₂ [1]

N₂O₄ [2]

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

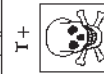
oxígeno

O₂

Clasificación.

T+; R 26 | C, R 34

Etiquetado.



R: 26-34
S: (1/2)-19-26-28-36/37/39-45

Clasificación.

O; R 8

Etiquetado.



R: 8
S: (2-)-17

Límites de concentración.

| | |
|-------------------|-------------------|
| C ≥ 10 % | T+, R 26-34 |
| 5 % ≤ C < 10 % | T, R 23-34 |
| 1 % ≤ C < 5 % | T; R 23-36/37/38 |
| 0,5 % ≤ C < 1 % | Xn; R 20-36/37/38 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | Xn; R 20 |

NOTA 5

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 7782-41-4

EEC No 231-954-8

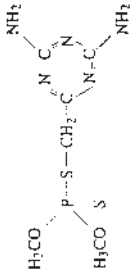
No 009-001-00-0

Cas No 78-57-9

EEC No 201-123-4

No 015-053-00-5

H₂



flúor

menazon

Clasificación

R 7 T + R 26 C R 35

Etiquetado

T +



C



R: 7-26-35

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

Clasificación

Xn R 22 R 52-53

Etiquetado

Xn



R: 22-52/53

S: (2)-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 7783-06-4

EEC No 231-977-3

No 016-001-00-4

Cas No 7446-09-5

EEC No 231-195-2

No 016-011-00-9






sulfuro de hidrógeno

Clasificación.

F+; R 12 T+; R 26 N; R 50

Etiquetado.

F+  T+  N 

R: 12-26-50
S: (1/2-19-16-28-36/37-45-61)

Límites de concentración.

| | |
|----------------|----------|
| C ≥ 10 % | T+; R 26 |
| 5 % ≤ C < 10 % | T; R 23 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xn; R 20 |
| | |
| | |

NOTA 5




dioxido de azufre

Clasificación.

T; R 23 C; R 34

Etiquetado.

T 

R: 23-34
S: (1/2-19-26-36/37/39-45)

Límites de concentración.

| | |
|-----------------|----------------|
| C ≥ 20 % | T; R 23-34 |
| 5 % ≤ C < 20 % | Xn; R 20-34 |
| 0,5 % ≤ C < 5 % | Xi; R 36/37/38 |
| | |
| | |

NOTA 5

Cas No 7782-50-5

EEC No 231-959-5

No 017-001-00-7

Cas No 7647-01-0

EEC No 231-995-7

No 017-002-00-2



Cl₂

cloro

Clasificación.

T; R 23 Xi; R 36/37/38 Ni; R 50

Etiquetado.

T  N 

R: 23-36/37/38-50
S: (1/2)-9-45-61

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



HCl

cloruro de hidrógeno

Clasificación.

T; R 23 C; R 35

Etiquetado.

T  C 

R: 23-35
S: (1/2)-9-26-36/37/39-45

Límites de concentración.

| | |
|--------------------|----------------|
| C ≥ 5 % | T; C; R 23-35 |
| 1 % ≤ C < 5 % | C; R 20-35 |
| 0,5 % ≤ C < 1 % | C; R 20-34 |
| 0,2 % ≤ C < 0,5 % | C; R 34 |
| 0,02 % ≤ C < 0,2 % | Xi; R 36/37/38 |
| | |

NOTA 5

Cas No 1333-82-0

EBC No 21.5-607-8

No 024-001-000-0

Cas No 7778-50-9

EBC No 231-906-6

No 024-002-00-6

NOTA E

NOTA E



tríóxido de cromo

dicromato de potasio

Clasificación

| | | | | | |
|--------|--------------------|---------|---------|------|------------|
| O: R 8 | Carc. Cat. 1; R 49 | T; R 25 | C; R 35 | R 43 | N; R 50-53 |
|--------|--------------------|---------|---------|------|------------|

Etiquetado

| | | | |
|------------------------|---|---|---|
| | | | |
| O | T | C | N |
| R: 49-8-25-35-43-50/53 | | | |
| S: 53-45-60-61 | | | |

Límites de concentración

| |
|--|
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |

Clasificación

| | | | | |
|--------------------|--------------------|----------|---------|----------|
| Carc. Cat. 2; R 49 | Muta. Cat. 2; R 46 | T+; R 26 | T; R 25 | Xn; R 21 |
|--------------------|--------------------|----------|---------|----------|

| | | |
|----------------|------|------------|
| Xi; R 37/38-41 | R 43 | N; R 50-53 |
|----------------|------|------------|

Etiquetado

| | |
|-------------------------------------|---|
| | |
| T+ | N |
| R: 49-46-21-25-26-37/38-41-43-50/53 | |
| S: 53-45-60-61 | |

Límites de concentración

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| C ≥ 7 % | T+; R 49-46-21-25-26-37/38-41-43 |
| 0,5 % ≤ C < 7 % | T; R 49-46-43 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | T; R 49-46 |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA 3

Cas No 7789-09-5

EEC No 232-143-1

No 024-003-00-1

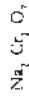
Cas No 10588-01-9

EEC No 234-190-3

No 024-004-00-7

NOTA E

NOTA B



dicromato de amonio




dicromato de sodio

Clasificación.

| | | | | | | |
|---|-----|--------|--------------------|--------------------|----------|---------|
| E | R 1 | O; R 8 | Carc. Cat. 2; R 49 | Muta. Cat. 2; R 46 | T+; R 26 | T; R 25 |
|---|-----|--------|--------------------|--------------------|----------|---------|

| | | | |
|----------|----------------|------|------------|
| Xn; R 21 | Xi; R 37/38-41 | R 43 | N; R 50-53 |
|----------|----------------|------|------------|

Etiquetado.




| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  | R: 49-46-1-8-21-25-26-37/38-41-43-50/53 S: 53-45-60-61 |
|---|---|---|---|

Clasificación.

| | | | | | |
|--------|--------------------|-----------------|----------|---------|----------|
| O; R 8 | Carc. Cat. 2; R 49 | Muta. Cat. R 46 | T+; R 26 | T; R 25 | Xn; R 21 |
|--------|--------------------|-----------------|----------|---------|----------|

| | | |
|----------------|------|------------|
| Xi; R 37/38-41 | R 43 | N; R 50-53 |
|----------------|------|------------|

Etiquetado.

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  | R: 49-46-8-21-25-26-37/38-41-43-50/53 S: 53-45-60-61 |
|---|---|---|---|

Límites de concentración.

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| C ≥ 7 % | T+; R 49-46-21-25-26-37/38-41-43 |
| 0,5 % ≤ C < 7 % | T; R 49-46-43 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | T; R 49-46 |
| | |
| | |

NOTA 3

Límites de concentración.

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| C ≥ 7 % | T+; R 49-46-21-25-26-37/38-41-43 |
| 0,5 % ≤ C < 7 % | T; R 49-46-43 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | T; R 49-46 |
| | |
| | |

NOTA 3

Cas No 14977-61-8

EEC No 239-056-8

No 024-005-00-2

Cas No 7789-00-6

EEC No 232-140-5

No 024-006-00-8

NOTA E

NOTA E



dicloruro de cromilo

romato de potasio

Clasificación,





Clasificación,



| | | | | | |
|--------|--------------------|--------------------|---------|------|------------|
| O; R 8 | Carc. Cat. 2; R 49 | Muta. Cat. 2; R 46 | C; R 35 | R 43 | N; R 50-53 |
|--------|--------------------|--------------------|---------|------|------------|

| | | | | |
|--------------------|--------------------|----------------|------|------------|
| Carc. Cat. 2; R 49 | Muta. Cat. 2; R 46 | Xi; R 36/37/38 | R 43 | N; R 50-53 |
|--------------------|--------------------|----------------|------|------------|

Etiquetado,

Etiquetado,

O  T  C  N 
 R: 49-46-8-35-43-50/53
 S: 53-45-60-61

T  N 
 R: 49-46-36/37/38-43-50/53
 S: 53-45-60-61

Límites de concentración,

Límites de concentración,

| | |
|-------------------|------------------------|
| C ≥ 10 % | T; C; R 49-46-35-43 |
| 5 % ≤ C < 10 % | T; R 49-46-34-43 |
| 0,5 % ≤ C < 5 % | T; R 49-46-36/37/38-43 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | T; R 49-46 |
| | |
| | |

| | |
|-------------------|------------------------|
| C ≥ 20 % | T; R 49-46-36/37/38-43 |
| 0,5 % ≤ C < 20 % | T; R 49-46-43 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | T; R 49-46 |
| | |
| | |

NOTA 3

NOTA 3

Cas No —

EEC No —

No 024-007-00-3

Cas No 13765-19-0

EEC No 237-366-8

No 024-008-00-9

NOTA A
NOTA E

NOTA E





cromatos de cinc, incluido el cromato de cinc y de potasio

cromato de calcio

Clasificación,

Carc. Cat. 1; R 45 Xn; R 22 R 43 N; R 50-53

Etiquetado,

| | | |
|---|---|-------------------|
| T | N | R: 45-22-43-50/53 |
|  |  | S: 53-45-60-61 |



Límites de concentración,

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación,

Carc. Cat. 2; R 45 Xn; R 22 N; R 50-53

Etiquetado,

| | | |
|---|---|----------------|
| T | N | R: 45-22-50/53 |
|  |  | S: 53-45-60-61 |

Límites de concentración,

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 7789-06-2

BEC No 232-142-6

No 024-009-00-4

Cas No 24613-89-6

BEC No 246-356-2

No 024-010-00-X



cromato de estroncio

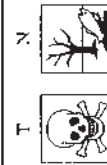
tris(cromato) de dicromo

NOTA E

Clasificación

Carc. Cat. 2, R 45 Xn1, R 22 N; R 50-53

Etiquetado



R: 45-22-50/53
S: 53-45-60-61

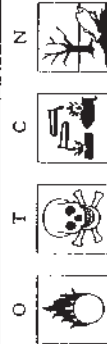
Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación

O, R 8 Carc. Cat. 2, R 45 C, R 35 R 43 N; R 50-53

Etiquetado



R: 45-8-35-43-50/53
S: 53-45-60-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 10034-85-2

EBC No 233-109-9

No 053-002-00-9

Cas No —

EBC No —

No 056-002-00-7

NOTA A

sales de bario, excepto el sulfato de bario, ácido 1-azo-2-hidroximetileno-2-sulfónico y aquellas específicamente expresadas en este anexo

HI


ioduro de hidrógeno

Clasificación,

C; R 35

Etiquetado,

C



R: 35
S: (1/2)-35-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

| | |
|--------------------|----------------|
| C ≥ 10 % | C; R 35 |
| 0,2 % ≤ C < 10 % | C; R 34 |
| 0,02 % ≤ C < 0,2 % | Xi; R 36/37/38 |
| | |
| | |
| | |


NOTA 5

Clasificación,

Xn; R 20/22

Etiquetado,

Xn



R: 20/22
S: (2)-28

Límites de concentración,

| | |
|---------|-------------|
| C ≥ 1 % | Xn; R 20/22 |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA 1

Cas No —

EEC No —

No 082-002-00-1

Cas No 7758-97-6

EEC No 231-846-0

No 082-004-00-2



derivados de alquiplomo

NOTA A
NOTA E





cromato de plomo

Clasificación.

| | | | | |
|--------------------|--------------------|----------------|------|------------|
| Repr. Cat. 1; R 61 | Repr. Cat. 3; R 62 | T+; R 26/27/28 | R 33 | N; R 50-53 |
|--------------------|--------------------|----------------|------|------------|

Etiquetado.

| | | | |
|--|---|---|---|
| T+ |  | N |  |
| R: 61-62-26/27/28-33-50/53 S: 53-45-60-61 | | | |

Límites de concentración.



| | |
|--------------------|-------------------------|
| C ≥ 5 % | T+; R 61-62-26/27/28-33 |
| 0,5 % ≤ C < 5 % | T+; R 61-26/27/28-33 |
| 0,1 % ≤ C < 0,5 % | T; R 61-23/24/25-33 |
| 0,05 % ≤ C < 0,1 % | Xn; R 20/21/22-33 |
| | |

NOTA I

Clasificación.

| | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|------|------------|
| Repr. Cat. 1; R 61 | Repr. Cat. 3; R 62 | Carc. Cat. 3; R 40 | R 33 | N; R 50-53 |
|--------------------|--------------------|--------------------|------|------------|

Etiquetado.

| | | | |
|--|---|---|---|
| T |  | N |  |
| R: 61-62-33-40-50/53 S: 53-45-60-61 | | | |

Límites de concentración.

NOTA I

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 77-73-6

EEC No 201-652-9

No 601-044-00-9

Cas No 74-95-3

EEC No 200-824-2

No 602-003-00-8






3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno

Clasificación

F: R 11 Xn: R 20/22 Xi: R 36/37/38 N: R 51-53

Etiquetado

F  Xn  N 

R: 11-20/22-36/37/38-51/53 S: (2)-36/37-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |




diclorometano

Clasificación

Xn: R 20 R 52-53

Etiquetado

Xn 

R: 20-52/53 S: (2)-24-61

Límites de concentración

| | |
|------------|----------|
| C ≥ 12,5 % | Xn: R 20 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 75-00-3

EEC No 200-830-5

No 602-009-00-0

Cas No 106-93-4

EEC No 203-444-5

No 602-010-00-6

NOTA E



cloroetano

1,2-dibromoetano

Clasificación:

F +; R 12; Cat. 3; R 40; R 52-53

Etiquetado:

F +



Xn



R: 12-40-52/53

S: (2)-16-33-36/37-61

Clasificación:

Cat. 2; R 45; T; R 23/24/25; Xi; R 36/37/38; Ni; R 51-53

Etiquetado:

T



N



R: 45-23/24/25-36/37/38-51/53

S: 53-45-61

Límites de concentración:

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración:

| | |
|-----------------|---------------------------|
| C ≥ 20 % | T; R 45-23/24/25-36/37/38 |
| 1 % ≤ C < 20 % | T; R 45-23/24/25 |
| 0,1 % ≤ C < 1 % | T; R 45-20/21/22 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 75-34-3

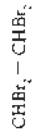
EBC No 200-863-5

No 602-011-00-1

Cas No 79-27-6

EBC No 201-191-5

No 602-016-00-9



1,1-dicloroetano

1,1,2,2-tetrabromoetano

Clasificación

F; R 11 Xn; R 22 Xi; R 36/37 R 52-53

Clasificación

T+; R 26 Xi; R 36 R 52-53

Etiquetado

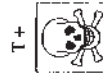


F Xn



R: 11-22-36/37-52/53
S: (2-)(16-23-61)

Etiquetado



T+

R: 26-36-52/53
S: (1/2-)(24-27-43-61)

Límites de concentración

| | |
|-------------------|----------------|
| C ≥ 20 % | Xn; R 22-36/37 |
| 12,5 % ≤ C < 20 % | Xn; R 22 |
| 1 % ≤ C < 7 % | T; R 23 |
| 0,1 % ≤ C < 1 % | Xn; R 20 |
| | |
| | |

Límites de concentración

| | |
|-----------------|-------------|
| C ≥ 20 % | T+; R 26-36 |
| 7 % ≤ C < 20 % | T+; R 26 |
| 1 % ≤ C < 7 % | T; R 23 |
| 0,1 % ≤ C < 1 % | Xn; R 20 |
| | |
| | |

Cas No 540-54-5 [1]
75-29-6 [2]

EEC No 208-749-7 [1]
200-838-8 [2]

No 602-018-00-X

Cas No 96-12-8

EEC No 202-479-3

No 602-021-00-6

NOTA C

NOTA E



1-cloropropano [1]; 2-cloropropano [2]

1,2-dibromo-3-cloropropano

Clasificación.

F, R 11 Xn; R 20/21/22

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45 Muta. Cat. 2; R 46 Repr. Cat. 1; R 60 T; R 25 Xn; R 48/20/22

Etiquetado.



R: 11-20/21/22
S: (2)-9-29

Etiquetado.



R: 45-46-60-25-48/20/22-52/53
S: 53-45-61

Límites de concentración.

| | |
|----------|----------------|
| C ≥ 25 % | Xn; R 20/21/22 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 543-59-9 [1]
625-29-6 [2]
616-20-6 [3]

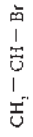
EEC No 208-846-4 [1]
210-885-7 [2]
210-467-4 [3]

No 602-022-00-1

Cas No 593-60-2

EEC No 209-800-6

No 602-024-00-2



NOTA C



1-cloropentano [1], 2-cloropentano [2], 3-cloropentano [3]

bromoetileno

Clasificación,

F: R 11 Xn: R 20/21/22

Etiquetas:

| | |
|----------------|---|
| F |  |
| Xn |  |
| R: 11-20/21/22 | |
| S: (2)-9-29 | |



Límites de concentración,

| | |
|----------|----------------|
| C ≥ 25 % | Xn: R 20/21/22 |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación,

F+: R 12 Cat: Cat. 2; R 45

Etiquetas:

| | |
|----------|---|
| F+ |  |
| T |  |
| R: 45-12 | |
| S: 53-45 | |

Límites de concentración,

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 540-59-0 [1]
156-59-2 [2]
156-60-5 [3]

EEC No 208-750-2 [1]
205-859-7 [2]
205-860-2 [3]

No 602-026-00-3

Cas No 79-01-6

EEC No 201-167-4

No 602-027-00-9



1,2-dicloroetileno [1], *cis*-dicloroetileno [2], *trans*-dicloroetileno [3]



tricloroetileno

NOTA C

Clasificación

F; R 11 Xn; R 20 R 52-53

Etiquetado

F  Xn 

R: 11-20-52/53
S: (2)-7-16-29-61


Límites de concentración:

| | |
|------------|----------|
| C ≥ 12,5 % | Xn; R 20 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación

Carc. Cat. 3; R 40 R 52-53

Etiquetado

Xn 

R: 40-52/53
S: (2)-23-36/37-61

Límites de concentración

| | |
|---------|----------|
| C ≥ 1 % | Xn; R 40 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 127-18-4

EEC No 204-825-9

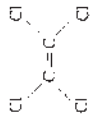
No 602-028-00-4

Cas No 542-75-6 [1]
10061-01-5 [2]

EEC No 208-826-5 [1]
233-195-8 [2]

No 602-030-00-5

NOTA D
NOTA C



tetraclorometileno

Clasificación

Carc. Cat. 3: R 40 N; R 51-53

Etiquetado

| | | |
|----|---|--------------------|
| Xn | N | R: 40-51/53 |
| | | S: (2-)23-36/37-61 |

Límites de concentración

| | |
|---------|----------|
| C ≥ 1 % | Xn, R 40 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



1,3-dicloropropeno [1], (Z)-1,3-dicloropropeno [2]

Clasificación

R 10 T, R 25 Xn; R 20/21 Xi; R 36/37/38 R 43 N; R 50-53

Etiquetado

| | | |
|---|---|----------------------------------|
| T | N | R: 10-20/21-25-36/37/38-43-50/53 |
| | | S: (1/2-)36/37-45-60-61 |

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 108-90-7

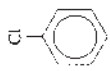
EEC No 203-628-5

No 602-033-00-1

Cas No 95-49-8 [1]
108-41-8 [2]
106-43-4 [3]
25168-05-2 [4]

EEC No 202-424-3 [1]
203-580-5 [2]
203-397-0 [3]
246-698-2 [4]

NOTA C.



clorobenceno

Clasificación.

R 10 Xn: R 20 Ni: R 51-53

Etiquetado.

| | | | |
|----------------|--|-----------------|--|
| Xn | | N | |
| R: 10-20-51/53 | | S: (2)-24/25-61 | |

Límites de concentración.

| | |
|---------|----------|
| C ≥ 5 % | Xn: R 20 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



2-clorotolueno [1], 3-clorotolueno [2], 4-clorotolueno [3], clorotolueno [4]

Clasificación.

Xn: R 20 Ni: R 51-53

Etiquetado.

| | | | |
|-------------|--|-----------------|--|
| Xn | | N | |
| R: 20-51/53 | | S: (2)-24/25-61 | |

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No —

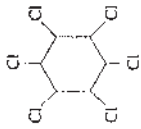
EEC No —

No 602-042-00-0

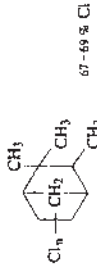
Cas No 8001-35-2

EEC No 232-283-3

No 602-044-00-1



NOTA C



toxafeno

1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexanos excepto los especialmente indicados en este Anexo

Clasificación.

| | | | |
|---------------------|----------|-----------|-------------|
| Carc. Cat. 3; R. 40 | T; R. 23 | Xn; R. 21 | N; R. 50-53 |
|---------------------|----------|-----------|-------------|

Etiquetado.

| | | |
|---|---|-----------------------------|
| T | N | R: 21-25-40-50/53 |
| | | S: ((1/2))22-36/37-45-60-61 |

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación.

| | | | | |
|---------------------|----------|-----------|--------------|-------------|
| Carc. Cat. 3; R. 40 | T; R. 25 | Xn; R. 21 | Xi; R. 37/38 | N; R. 50-53 |
|---------------------|----------|-----------|--------------|-------------|

Etiquetado.

| | | |
|---|---|--------------------------|
| T | N | R: 21-25-37/38-40-50/53 |
| | | S: ((1/2))36/37-45-60-61 |

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 120-83-2

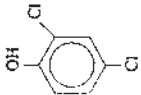
EBC No 204-429-6

No 604-011-00-7

Cas No 59-50-7

EBC No 200-431-6

No 604-014-00-3





2,4-diclorofenol

Clasificación

Xn; R 21/22 C; R 34 N; R 51-53

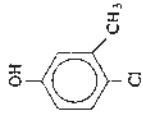
Etiquetado

C  N 

R: 21/22-34-51/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |





clororesol

Clasificación

Xn; R 21/22 Xi; R 41 R 43 N; R 50

Etiquetado

Xn  N 

R: 21/22-41-43-50 S: (2)-26-36/37/39-61

Límites de concentración

| | |
|----------------|-------------------|
| C ≥ 10 % | Xn; R 21/22-41-43 |
| 5 % ≤ C < 10 % | Xn; R 21/22-36-43 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xi; R 43 |
| | |
| | |
| | |

Cas No 50-00-0

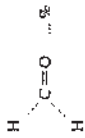
EEC No 200-001-8

No 605-001-00-5

Cas No 541-41-3

EEC No 208-778-5

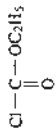
No 607-020-00-4



formaldehído ... %

NOTA B
NOTA D

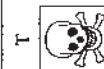
cloroformiato de etilo



Clasificación,

Carc. Cat. 3; R 40 T; R 23/24/25 C; R 34 R 43

Etiquetado,



R: 23/24/25-34-40-43
S: (1/2)-26-36/37/39-45-51

Clasificación,

F; R 11 T+; R 26 Xn; R 22 C; R 34

Etiquetado,



R: 11-22-26-34
S: (1/2)-9-16-26-28-33-36/37/39-45

Límites de concentración,

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| C ≥ 25 % | T; R 23/24/25-34-40-43 |
| 5 % ≤ C < 25 % | Xn; R 20/21/22-36/37/38-40-43 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xn; R 40-43 |
| 0,2 % ≤ C < 1 % | Xi; R 43 |
| | |
| | |

Límites de concentración,

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 98-95-3

EEC No 202-716-0

No 609-003-00-7

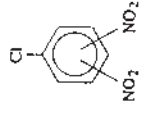
Cas No —

EEC No —

No 610-003-00-4



nitrobenzeno





clorodinitrobenzeno

NOTA C

Clasificación

Carc. Cat. 3; R. 40 Repr. Cat. 3; R. 62 T. R. 23/24/25-48/23/24 N. R. 51-53

Etiquetado

T  N 

R: 23/24/25-40-49/23/24-51/53-62
S: (1/2)-28-36/37-45-61



Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación

T. R. 23/24/25 R. 33 N. R. 50-53

Etiquetado

T  N 

R: 23/24/25-33-50/53
S: (1/2)-28-36/37-45-60-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No —

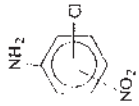
EEC No —

No 610-006-00-0

Cas No 74-89-5 [1]
124-40-3 [2]
75-50-3 [3]

EEC No 200-820-0 [1]
204-697-4 [2]
200-875-0 [3]

No 612-001-00-5





cloronitroaminas excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación.

T+; R 26/27/28 R 33 N; R 51-53

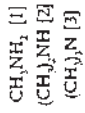
Etiquetado.

T+  N 

R: 26/27/28-33-51/53
S: (1/2)-28-36/37-45-61

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |





metilamina (mono-(1), di-(2) y tri-(3))

Clasificación.

F+; R 12 Xn; R 20 Xi; R 37/38-41

Etiquetado.

F+  Xn 

R: 12-20-37/38-41
S: (2)-16-26-39

Límites de concentración.

NOTA 5

| | |
|-----------------|-------------------|
| C ≥ 5 % | Xn; R 20-37/38-41 |
| 0,5 % ≤ C < 5 % | Xi; R 36 |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA C

Cas No 109-89-7

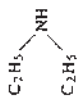
EEC No 203-716-3

No 612-003-00-X

Cas No 121-44-8

EEC No 204-469-4

No 612-004-00-5



diethylamina

Clasificación

F: R 11 Xn: R 20/21/22 C: R 35

Etiquetado



R: 11-20/21/22-35
S: (1/2)-3-16-26-29-36/37/39-45

Límites de concentración

| | |
|-----------------|------------------|
| C ≥ 25 % | C: R 20/21/22-35 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C: R 35 |
| 5 % ≤ C < 10 % | C: R 34 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xi: R 36/37/38 |
| | |
| | |



triethylamina

Clasificación

F: R 11 Xn: R 20/21/22 C: R 35

Etiquetado



R: 11-20/21/22-35
S: (1/2)-3-16-26-29-36/37/39-45

Límites de concentración

| | |
|-----------------|------------------|
| C ≥ 25 % | C: R 20/21/22-35 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C: R 35 |
| 5 % ≤ C < 10 % | C: R 34 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xi: R 36/37/38 |
| | |
| | |

Cas No 109-73-9

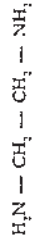
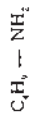
EEC No 203-699-2

No 612-005-00-0

Cas No 107-15-3

EEC No 203-468-6

No 612-006-00-6



butilamina

etilendiamina



Clasificación:

F; R 11 Xn; R 20/21/22 C; R 35


Clasificación:

R 10 Xn; R 21/22 C; R 34 R 42/43

Etiquetado:

F  C 

R: 11-20/21/22-35
S: (1/2-3)-16-26-29-36/37/39-45

C 

R: 10-21/22-34-42/43
S: (1/2-3)-23-26-36/37/39-45

Límites de concentración:

| | |
|-----------------|------------------|
| C ≥ 25 % | C; R 20/21/22-35 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 35 |
| 5 % ≤ C < 10 % | C; R 34 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xn; R 36/37/38 |
| | |
| | |

Límites de concentración:

| | |
|-----------------|---------------------|
| C ≥ 25 % | C; R 21/22-34-42/43 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 34-42/43 |
| 2 % ≤ C < 10 % | Xn; R 36/38-42/43 |
| 1 % ≤ C < 2 % | Xn; R 42/43 |
| | |
| | |

Cas No

EEC No

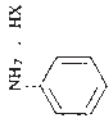
No 612-009-00-2

Cas No

EEC No

No 612-010-00-8

NOTA A



sales de anilina

Clasificación

| | | | |
|--------------------|------------------|----------------|---------|
| Carc. Cat. 3; R 40 | T; R 48/23/24/25 | Xn; R 20/21/22 | N; R 50 |
|--------------------|------------------|----------------|---------|

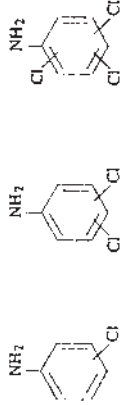
Etiquetado

| | | |
|---|---|-------------------------------|
| T | N | R: 20/21/22-40-48/23/24/25-50 |
| | | S: (1/2)-28-36/37-45-61 |

Límites de concentración

| | |
|-----------------|------------------------------|
| C ≥ 1 % | T; R 20/21/22-40-48/23/24/25 |
| 0,2 % ≤ C < 1 % | Xn; R 48/20/21/22 |
| | |
| | |
| | |

NOTA C



cloroanilina (mono-, di-, tri-)

Clasificación

| | | |
|---------------|------|------------|
| T; R 23/24/25 | R 33 | N; R 50-53 |
|---------------|------|------------|

Etiquetado

| | | |
|---|---|----------------------------|
| T | N | R: 23/24/25-33-50/53 |
| | | S: (1/2)-28-36/37-45-60-61 |

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

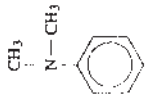
Cas No 121-69-7

EEC No 204-493-5

No 612-016-00-0

Cas No 2844-92-0

No 612-019-00-7





N,N-dimetilanilina

Clasificación.

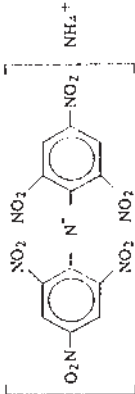
| | | | |
|---------------|-------|---------------|------------|
| Carc. Cat. 3. | R: 40 | T: R 23/24/25 | N: R 51-53 |
|---------------|-------|---------------|------------|

Etiquetado.

| | | | |
|----------------------|---|-------------------------|---|
| T |  | N |  |
| R: 23/24/25-40-51/53 | | S: (1/2)-28-36/37-45-61 | |

Límites de concentración^m

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |






dipicrilamina, sal amónica

Clasificación.

| | | | | | |
|---|-----|----|------------|------|------------|
| E | R 1 | T+ | R 26/27/28 | R 33 | N: R 51-53 |
|---|-----|----|------------|------|------------|

Etiquetado.

| | | | | | |
|------------------------|---|-------------------------|---|---|---|
| E |  | T+ |  | N |  |
| R: 1-26/27/28-33-51/53 | | S: (1/2)-28-36/37-45-61 | | | |

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 134-327

EEC No 205-138-7

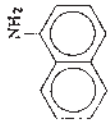
No 612-020-00-2

Cas No 91-59-8

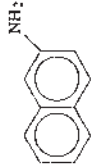
EEC No 202-080-4

No 612-022-00-3

NOTA E



1-naftilamina



2-naftilamina

Clasificación:

Xn: R 22 N: R 51-53

Etiquetado:



Xn  N 

R: 22-51/53
S: (2)-24-61

Clasificación:

Carc. Cat. I: R 45 Xn: R 22 N: R 51-53

Etiquetado:

T  N 

R: 45-22-51/53
S: 53-45-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración:

| | |
|-------------------|------------|
| C ≥ 25 % | T: R 45-22 |
| 0,01 % ≤ C < 25 % | T: R 45 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 142-84-7

EEC No 205-565-9

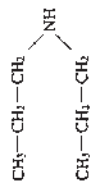
No 612-048-00-5

Cas No 611-21-2 [1]
696-44-6 [2]
623-08-5 [3]

EEC No 210-260-9 [1]
211-795-0 [2]
210-769-6 [3]

No 612-055-00-3

NOTA C





dipropilamina

Clasificación,

F; R 11 Xn; R 20/21/22 C; R 35

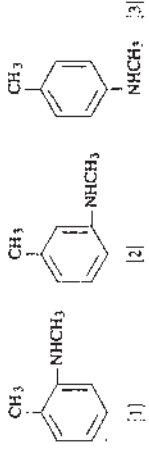
Etiquetado,

F  C 

R: 11-20/21/22-35
S: (1/2-1)6-26-36/37/39-45

Límites de concentración

| | |
|-----------------|------------------|
| C ≥ 25 % | C; R 20/21/22-35 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 35 |
| 5 % ≤ C < 10 % | C; R 34 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xi; R 36/37/38 |
| | |
| | |




N-metil-o-toluidina [1]; N-metil-m-toluidina [2]; N-metil-p-toluidina [3]

Clasificación, Klassifizierung, Emisfang, Takvörpön, Classification,
Classificazione, Indeltung, Classificazio, Luokitus, Klassifizierung

T; R 23/24/25 R 33 R 52-53

Etiquetado, Etikettering, Kennzeichnung, Emisjuvörpön, Labelling,
Etiquetage, Etichetaziona, Kennekeren, Rotulagem, Merknomi, Märkning

T 

R: 23/24/25-33-52/53
S: (1/2-)28-36/37-45-61

Límites de concentración,

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 110-85-0

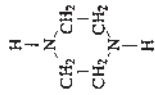
EEC No 203-808-3

No 612-037-00-4

Cas No 56-18-8

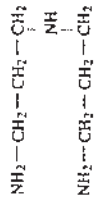
EEC No 200-261-2

No 612-063-00-7



piperazina

3,3'-iminodi(propilamina)



Clasificación:

C; R 34 R 42/43 R 52/53

Etiquetado:

C



R: 34-42/43-52/53

S: (1/2)-22-26-36/37/39-45-61

Clasificación:

T+; R 26 T; R 24 Xn; R 22 C; R 35 R 43

Etiquetado:

T+



C



R: 22-24-26-35-43

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

Límites de concentración:

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración:

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No ---

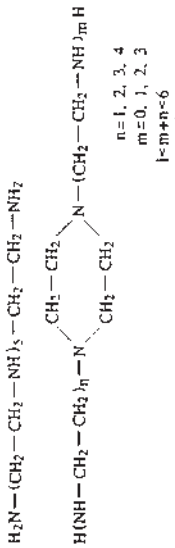
EEC No ---

No 612-065-00-8

Cas No 101-83-7

EEC No 202-980-7

No 612-066-00-3



polietilendipoliaminas excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo

Clasificación,

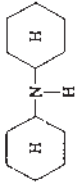
Xn; R 21/22 C; R 34 R 43 N; R 50-53

Etiquetado,

R: 21/22-34-43-50/53
 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración,

| | |
|----------------------|------------------|
| $C \geq 25\%$ | C; R 21/22-34-43 |
| $10\% \leq C < 25\%$ | C; R 34-43 |
| $5\% \leq C < 10\%$ | Xi; R 36/38-43 |
| $1\% \leq C < 5\%$ | Xi; R 43 |
| | |
| | |



dicyclohexilamina

Clasificación,

Xn; R 22 C; R 34 N; R 50-53

Etiquetado,

R: 22-34-50/53
 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración,

| | |
|----------------------|-------------|
| $C \geq 25\%$ | C; R 22-34 |
| $10\% \leq C < 25\%$ | C; R 34 |
| $2\% \leq C < 10\%$ | Xi; R 36/38 |
| | |
| | |

Cas No 2855-13-2

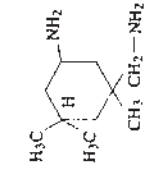
BEC No 220-666-8

No 612-067-00-9

Cas No 612-83-9
64969-34-2
74332-73-3

EEC No 210-323-0
265-293-1
277-822-3

No 612-069-00-X



3-aminometil-3,5,5-trimetilciclohexilamina


NOTA A
NOTA E

sales de 3,3'-diclorobencidina

Clasificación

Xn; R 21/22 C; R 34 R 43 R 52/53

Etiquetado



C 

R: 21/22-34-43-52/53
S: (1/2)-26-36/37/39-45-61

Clasificación

Carc. Cat. 2; R 45 Xn; R 21 R 43 N; R 50-53

Etiquetado

T  N 

R: 45-21-43-30/53
S: 53-45-60-61

Límites de concentración

| | |
|-----------------|------------------|
| C ≥ 25 % | C; R 21/22-34-43 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 34-43 |
| 5 % ≤ C < 10 % | Xi; R 36/38-43 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xi; R 43 |
| | |
| | |

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No —

EEC No —

No 612-079-00-4

NOTA A
NOTA E

Cas No 612-82-8
64869-36-4
74753-18-7

EEC No 210-322-5
265-294-7
277-985-0

No 612-081-00-5



NOTA A
NOTA E

sales de 2,2'-dicloro-4,4'-metilendiánilina; sales de 4,4'-metilénbis(2-cloroanilina)

Clasificación

Carc. Cat. 2; R 45; Xn; R 22; N; R 50-53

Etiquetado

| | | | |
|----------------|---|----------------|---|
| T |  | N |  |
| R: 45-22-50/53 | | S: 53-45-60-61 | |

Límites de concentración



| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

sales de 3,3'-dimetilbencidina; sales de o-tolidina

Clasificación

Carc. Cat. 2; R 45; Xn; R 22; N; R 51-53

Etiquetado

| | | | |
|----------------|---|-------------|---|
| T |  | N |  |
| R: 45-22-51/53 | | S: 53-45-61 | |

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 2243-62-1

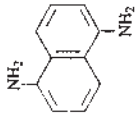
EEC No 218-817-8

No 612-089-00-9

Cas No 95-53-4

EEC No 202-429-0

No 612-091-00-X



1,5-naftilenediamina

Clasificación

Carc. Cat. 3; R: 40 N; R: 50-53

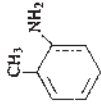
Etiquetado



R: 40-50/53
S: (2-3)6/37-60-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



o-toluidina

Clasificación

Carc. Cat. 2; R: 45 T; R: 23/25 Xi; R: 36 N; R: 50

Etiquetado



R: 45-23/25-36-50
S: 53-45-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA E

Cas No 492-80-8

EEC No 207-762-5

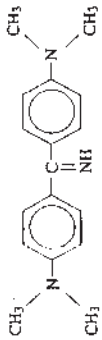
No 612-096-00-7

Cas No —

EEC No —

No 612-097-00-2

NOTA A



4,4'-carbonimididobis[N,N-dimethylaniline]⁺

sales de 4,4'-carbonimididobis[N,N-dimethylanilina]

Clasificación

Carc. Cat. 3; R: 40 Xn; R: 22 Xi; R: 36 N; R: 51-53

Etiquetado



R: 22-36-40-51/53
S: (2)-36/37-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación

Carc. Cat. 3; R: 40 Xn; R: 22 Xi; R: 36 N; R: 51-53

Etiquetado



R: 22-36-40-51/53
S: (2)-36/37-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 621-64-7

EEC No 210-698-0

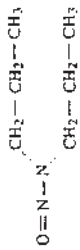
No 612-098-00-8

Cas No 95-80-7

EEC No 202-433-1

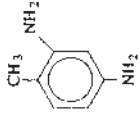
No 612-099-00-3

NOTA E



nitrosodipropilamina

NOTA E

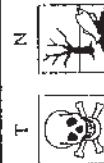


4-metil-m-fenilendiamina

Clasificación

Carc. Cat. 2; R: 45 Xn; R: 22 N; R: 51-53

Etiquetado



R: 45-22-51/53
S: 53-45-61

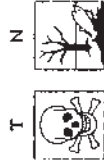
Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Clasificación

Carc. Cat. 2; R: 45 T; R: 25 Xn; R: 21 Xi; R: 36 R: 43 N; R: 50-53

Etiquetado



R: 45-21-25-36-43-50/53
S: 53-45-60-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 98-84-0 [1]
618-36-0 [2]

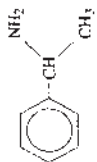
EEC No 202-706-6 [1]
210-343-8 [2]

No 612-107-00-5

Cas No 6864-37-5

EEC No 229-962-1

No 612-110-00-1



1-feniletamina [1]; DL- α -metilbencilamina [2]

Clasificación.

Xn: R 21/22 C, R 34

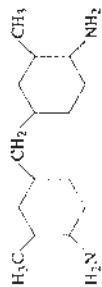
Etiquetado.

C

R: 21/22-34
S: (1/2)26-28-36/37/39-45

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



2,2'-dimetil-4,4'-metilénbis(ciclohexilamina)

Clasificación.

T, R 23/24 Xn; R 22 C, R 35 N, R 51-53

Etiquetado.

T C N

R: 22-23/24-35-51/53
S: (1/2)26-36/37/39-45-61

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 90989-39-2

EEC No 292-695-4

No 649-403-00-9

NOTA H
NOTA P

Cas No 7789-12-0

A N E X O A-11

BEC No 234-190-3

No 024-004-01-4

NOTA E




hidrocarburos aromáticos, C_{10} : Nafta de baja temperatura de inflamación, sin especificar

dicromato de sodio, dihidrato

Clasificación.

Carc. Cat. 2: R 45 Xn: R 65

Etiquetado.

T 



R: 45-65
S: 53-45

Clasificación.

Carc. Cat. 2: R 49 Muñ. Cat. 2: R 46 T+: R 26 T: R 25 Xn: R 21

Xe: R 37/38-41 R 43 N: R 50-53

Etiquetado.

T+  N 

R: 49-46-21-25-26-37/38-41-43-50/53
S: 53-45-60-61

Límites de concentración.

| | |
|-------------------------|------------|
| $C \geq 10 \%$ | T; R 45-65 |
| $0,1 \% \leq C < 10 \%$ | T; R 45 |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA 4

Límites de concentración.

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| $C \geq 7 \%$ | T+; R 49-46-21-25-26-37/38-41-43 |
| $0,5 \% \leq C < 7 \%$ | T; R 49-46-43 |
| $0,1 \% \leq C < 0,5 \%$ | T; R 49-46 |
| | |
| | |
| | |

NOTA 3

Cas No 1111-30-8

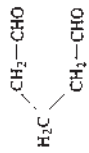
EEC No 203-856-5

No 605-022-00-X

Cas No 19666-30-9

EEC No 243-215-7

No 606-045-00-8

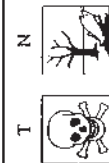


glucaral

Clasificación

T: R 23/25 C: R 34 R 42/43 N: R 50

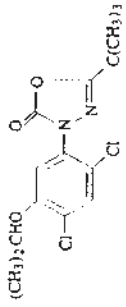
Etiquetado



R: 23/25-34-42/43-50
S: (1/2)-26-36/37/39-45-61

Límites de concentración

| | |
|-----------------|----------------------------|
| C ≥ 50 % | T: R 23/25-34-42/43 |
| 25 % ≤ C < 50 % | T: R 22-23-34-42/43 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C: R 20/22-34-42/43 |
| 2 % ≤ C < 10 % | Xn: R 20/22-37/38-41-42/43 |
| 1 % ≤ C < 2 % | Xn: R 36/37/38-42/43 |
| 0,5 % ≤ C < 1 % | Xi: R 36/37/38-43 |

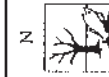


5-(1,1-dimetil)-3-[2,4-dicloro-5-(1-metiletóxil)fenil]-5-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona

Clasificación

N: R 50-53

Etiquetado



R: 50/53
S: 60-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 127-68-4

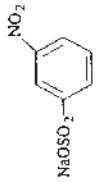
EEC No 204-857-3

No 609-048-00-2

Cas No 121-87-9

EEC No 204-502-2

No 610-009-00-7



3-nitrobenzenosulfonato de sodio

Clasificación.

Xi: R 36 R 43

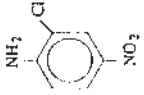
Etiquetado.

Xi

R: 36-43 S: (2)/24-26-37

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



2-cloro-4-nitroanilina

Clasificación.

Xn: R 22 N: R 51-53

Etiquetado.

Xn

N

R: 22-51/53 S: (2)-22-24-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 2602-46-2

EEC No 220-012-1

No 611-026-00-2

Cas No 2602-46-2

EEC No 220-012-1


No 611-026-00-2

Clasificación.

Carc. Cat. 2; R 45 Repr. Cat. 3; R 63

Etiquetado.

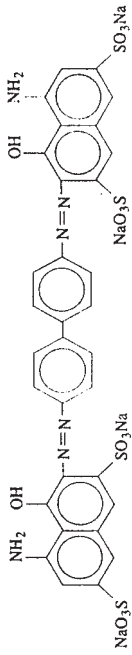
T



R: 45-63
S: 53-45

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



3,3'-[[1,1'-bifenil]-4,4'-diilbis(azo)bis[5-amino-4-hidroxi-naftaleno-2,7-disulfonato] de tetrasodio

Cas No 573-58-0

EBC No 209-358-4

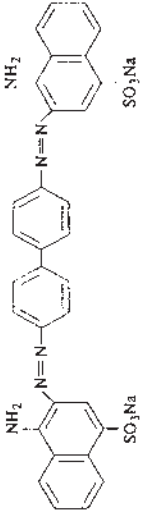
No 611-027-00-8

Cas No 74-89-5 [1]
124-40-3 [2]
75-50-3 [3]

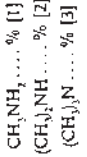
EEC No 200-820-0 [1]
204-697-4 [2]
200-873-0 [3]

No 612-001-01-6

NOTA B



3,3'-[[1,1'-bitenil]-4,4'-diilbis(azo)]bis(4-aminonafaleno-1-sulfonato) de sodio




metilamina (mono[1], di[2] y tri[3]) ... %

Clasificación.

Carc. Cat. 2, R 45 Repr. Cat. 3, R 63

Etiquetado.



T 

R: 45-63
S: 53-45

Clasificación.

F+; R 12 Xn; R 20/22 C; R 34

Etiquetado.

P+  C 

R: 12-20/22-34
S: (1/2,3)-16-26-29-36/37/39-45

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración.

| | |
|------------------------|----------------|
| $C \geq 15 \%$ | C; R 20/22-34 |
| $10 \% \leq C < 15 \%$ | C; R 34 |
| $5 \% \leq C < 10 \%$ | Xn; R 36/37/38 |
| | |
| | |
| | |

Cas No 74070-46-5

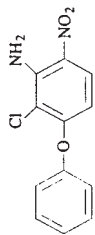
EEC No 277-704-1

No 612-120-00-6

Cas No 68131-73-7

EEC No 268-626-9

No 612-121-00-1



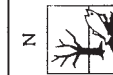
2-cloro-3-fenoxi-6-nitro-anilina

aminas, polietilenpoli-, HEPA

Clasificación:

N; R 50-53

Etiquetado:



R: 50/53
S: 60-61

Clasificación:

Xn; R 21/22 C; R 34 R; R 43 N; R 50-53

Etiquetado:



R: 21/22-34-43-50/53
S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Límites de concentración

| | |
|-----------------|------------------|
| C ≥ 25 % | C; R 21/22-34-43 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 34-43 |
| 5 % ≤ C < 10 % | Xi; R 36/38-43 |
| 1 % ≤ C < 5 % | Xi; R 43 |
| | |
| | |

Cas No 5470-11-1 [1]
10039-54-0 [2]
10046-00-1 [3]

EEC No 226-798-2 [1]
233-118-8 [2]
233-154-4 [3]

No 612-123-00-2

Cas No 138-24-9

EEC No 205-319-0

No 612-124-00-8

Clasificación.

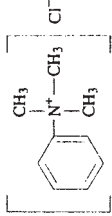
Xn: R 22-48/22 Xi: R 36/38 R 43 N: R 50

Enquetado.

| | | | |
|----|--|----|----------------------|
| Xn | | N | |
| | | R: | 22-36/38-43-48/22-50 |
| | | S: | (2-)22-24-37-61 |

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |



cloruro de N,N,N-trimetilanilinio

Clasificación.

T, R 24/25

Etiquetado.

| | |
|--|----------------------------------|
| | R: 24/25 S: (1/2-)25-39-45-53 |
|--|----------------------------------|

Límites de concentración.

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 95-70-5

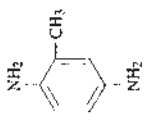
EEC No 202-442-1

No 612-125-00-3

Cas No 65321-67-7

EEC No 265-697-8

No 612-126-00-9





2-metil-p-tolendiamina

Clasificación .

| | | | |
|---------|-------------|------|-------------|
| T: R 25 | Xn: R 20/21 | R 43 | Ni: R 50-53 |
|---------|-------------|------|-------------|

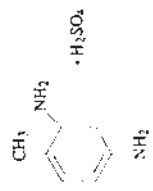
Etiquetado .

| | | | | |
|---|---|---|---|--------------------------|
| T |  | N |  | R: 20/21-25-43-50/53 |
| | | | | S: (1/2-2)24-37-45-60-61 |

Límites de concentración .

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

NOTA E



sulfato de tolueno-2,4-diamonio

Clasificación .

| | | | | | |
|--------------------|---------|----------|----------|------|------------|
| Carc. Cat. 2: R 45 | T: R 25 | Xn: R 21 | Xi: R 36 | R 43 | N: R 50-53 |
|--------------------|---------|----------|----------|------|------------|

Etiquetado .

| | | | | |
|---|---|---|---|-------------------------|
| T |  | N |  | R: 45-21-25-36-43-50/53 |
| | | | | S: 53-45-60-61 |

Límites de concentración .

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No 108-18-9

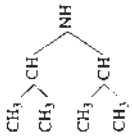
EEC No 203-558-5

No 612-129-00-5

Cas No 149-30-4

EEC No 205-736-8

No 613-108-00-3





diisopropilamina

Clasificación

F: R 11 Xn: R 20/22 C: R 34

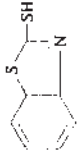
Etiquetado

F  C 

R: 11-20/22-34 S: (1/2+)(6-26-36/37/39-45)

Límites de concentración

| | |
|-----------------|----------------|
| C ≥ 25 % | C; R 20/22-34 |
| 10 % ≤ C < 25 % | C; R 34 |
| 5 % ≤ C < 10 % | Xi; R 36/37/38 |
| | |
| | |
| | |





benzotiazol-2-tiol

Clasificación

R 43 N; R 50-53

Etiquetado

Xi  N 

R: 43-50/53 S: (2-24-37-60-61)

Límites de concentración

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Cas No —

EBC No —

No 647-016-00-X

ANEXO A
PARTE III

Entradas que quedan suprimidas

amílase excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo


ANEXO A-III

- 008-002-00-3 648-157-00-x
- 612-045-00-9 648-158-00-5
- 648-011-00-5 648-159-00-0
- 648-025-00-1 649-192-00-3

Clasificación,

R 42

Etiquetado,

| | |
|-------|---|
| Xn |  |
| R: 42 | S: (2-)22-24-36/37 |

Límites de concentración,

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

ANEXO A
PARTE IV

Entradas en las que se sustituyen todas las referencias a la frase R-22 por la R-65

ANEXO B

PARTE I

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| 649-261-00-8 | 649-305-00-6 | 649-394-00-1 |
| 649-262-00-3 | 649-306-00-1 | 649-395-00-7 |
| 649-263-00-9 | 649-307-00-7 | 649-396-00-2 |
| 649-264-00-4 | 649-308-00-2 | 649-397-00-8 |
| 649-265-00-X | 649-309-00-8 | 649-398-00-3 |
| 649-266-00-5 | 649-310-00-3 | 649-399-00-9 |
| 649-267-00-0 | 649-311-00-9 | 649-400-00-2 |
| 649-268-00-6 | 649-312-00-4 | 649-401-00-8 |
| 649-269-00-1 | 649-313-00-X | 649-402-00-3 |
| 649-270-00-7 | 649-314-00-5 | 649-403-00-9 |
| 649-271-00-2 | 649-316-00-6 | 649-404-00-4 |
| 649-272-00-8 | 649-317-00-1 | 649-405-00-X |
| 649-273-00-3 | 649-318-00-7 | 649-406-00-5 |
| 649-274-00-9 | 649-319-00-2 | 649-407-00-0 |
| 649-275-00-4 | 649-320-00-8 | 649-408-00-6 |
| 649-276-00-X | 649-321-00-3 | 649-409-00-1 |
| 649-277-00-5 | 649-322-00-9 | 649-410-00-7 |
| 649-278-00-0 | 649-323-00-4 | 649-411-00-2 |
| 649-279-00-6 | 649-324-00-X | 649-412-00-8 |
| 649-280-00-1 | 649-325-00-5 | 649-413-00-3 |
| 649-281-00-7 | 649-326-00-0 | 649-414-00-9 |
| 649-282-00-2 | 649-327-00-6 | 649-415-00-4 |
| 649-283-00-8 | 649-328-00-1 | 649-416-00-X |
| 649-284-00-3 | 649-329-00-7 | 649-417-00-5 |
| 649-285-00-9 | 649-330-00-2 | 649-418-00-0 |
| 649-286-00-4 | 649-331-00-8 | 649-419-00-6 |
| 649-287-00-X | 649-332-00-3 | 649-420-00-1 |
| 649-288-00-5 | 649-333-00-9 | 649-421-00-7 |
| 649-289-00-0 | 649-334-00-4 | 649-422-00-2 |
| 649-290-00-6 | 649-335-00-X | 649-423-00-8 |
| 649-291-00-1 | 649-336-00-5 | 649-424-00-3 |
| 649-292-00-7 | 649-337-00-0 | 649-425-00-9 |
| 649-293-00-2 | 649-338-00-6 | 649-426-00-4 |
| 649-294-00-8 | 649-339-00-1 | 649-427-00-X |
| 649-295-00-3 | 649-340-00-7 | 649-428-00-5 |
| 649-296-00-9 | 649-341-00-2 | 649-429-00-0 |
| 649-297-00-4 | 649-342-00-8 | 649-430-00-6 |
| 649-298-00-X | 649-343-00-3 | 649-431-00-1 |
| 649-299-00-5 | 649-344-00-9 | 649-432-00-7 |
| 649-300-00-9 | 649-345-00-4 | 649-433-00-2 |
| 649-301-00-4 | 649-346-00-X | 649-434-00-8 |
| 649-302-00-X | 649-347-00-5 | |
| 649-303-00-5 | 649-348-00-0 | |
| 649-304-00-0 | 649-349-00-6 | |

Texto que sustituye el encabezamiento y la introducción general de la parte B, del Anexo V, del Reglamento.

PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD Y OTROS EFECTOS SOBRE LA SALUD

INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B

A. NOTA EXPLICATIVA

Para los fines de la presente introducción, se aplicará la siguiente numeración:

- B.15** Mutación génica en *Saccharomyces cerevisiae*
B.16 Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*
B.17 Mutación génica de células de mamífero *in vitro*
B.18 Lesión y reparación de ADN: síntesis de ADN no programada en células de mamífero *in vitro*
B.19 Ensayo *in vitro* de intercambio de cromátidas hermanas
B.20 Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*
B.21 Ensayo de transformación de células de mamífero *in vitro*
B.22 Ensayo de letalidad dominante en roedores
B.23 Ensayo citogénico en células germinales de mamífero *in vivo*
B.24 Ensayo de la mancha en ratón
B.25 Translocación hereditaria en ratón
B.26 Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en roedores
B.27 Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en no roedores
B.28 Toxicidad dérmica subcrónica: ensayo de 90 días en roedores
B.29 Toxicidad subcrónica por inhalación: ensayo de 90 días en roedores
B.30 Ensayo de toxicidad crónica
B.31 Estudio de teratogenicidad: roedores y no roedores
B.32 Ensayo de carcinógenesis
B.33 Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinógenesis
B.34 Ensayo de toxicidad para la reproducción en una generación
B.35 Ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones
B.36 Toxicocinética
B.37 Neurotoxicidad retardada de sustancias organofosforadas por administración única
B.38 Neurotoxicidad retardada de sustancias organofosforadas. Estudio por administración continuada de 28 días

B. DEFINICIONES GENERALES DE LOS TÉRMINOS UTILIZADOS EN LOS MÉTODOS DE ENSAYO DEL PRESENTE ANEXO

- (ii) Toxicidad aguda incluye los efectos nocivos que se manifiestan durante un período dado (habitualmente 14 días) después de la administración de una dosis única de una sustancia.
- (iii) Toxicidad evidente es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de una sustancia. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del riesgo y deben ser tales que, ante un aumento de la dosis administrada, pueda esperarse la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.
- (iv) Dosis es la cantidad de sustancia administrada. La dosis se expresa en peso (gramos o miligramos) o en peso de sustancia por unidad de peso del animal (por ejemplo, miligramos por kilogramo de peso corporal), o en concentración alimentaria constante (partes por millón o miligramos por kilogramo de alimento).
- (v) Dosis discriminante es la dosis más elevada de las cuatro establecidas que se puede administrar sin que se produzca mortalidad debida a la sustancia (incluyendo el sacrificio por motivos compasivos).
- (vi) Dosificación es un término general que incluye la dosis y la frecuencia y duración de su administración.
- (vii) DL₅₀ (dosis letal media) es la dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL₅₀ se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilogramo).
- (viii) CL₅₀ (concentración letal media) es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50 % de los animales expuestos a dicha sustancia durante un período determinado.
- El valor de la CL₅₀ se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro).
- (ix) NOAEL son las siglas inglesas de nivel sin efectos adversos observados, que es la dosis o nivel de exposición máximo sin que se observe ningún signo adverso relacionado con el tratamiento.
- (x) Toxicidad subcrónica (por administración continuada) incluye los efectos adversos que aparecen en los animales de laboratorio cuando reciben repetidamente dosis diarias de una sustancia o cuando están expuestos diariamente a la misma durante un período de tiempo breve, en comparación con su expectativa de vida.
- (xi) Dosis máxima tolerada (DMT) es el nivel más alto de dosis que produce signos de toxicidad en los animales sin alterar de forma importante la supervivencia en relación con la prueba en la que se usa.
- (xii) Irritación cutánea es la producción de modificaciones inflamatorias de la piel que aparecen después de la aplicación de la sustancia.
- (xiii) Irritación ocular es la producción de modificaciones inflamatorias del ojo que aparecen después de la aplicación de la sustancia sobre la superficie anterior del ojo.
- (xiv) Sensibilización de la piel (dermatitis alérgica de contacto) es una reacción cutánea, de origen inmunológico, a una sustancia.
- (xv) Corrosión dérmica es la producción de lesiones úsulares irreversibles en la piel que aparecen después de la aplicación de la sustancia durante un período de 3 minutos a 4 horas.
- (xvi) Toxicocinética es el estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias de prueba.
- (xvii) Absorción es el proceso o procesos por los que penetra en el organismo una sustancia administrada.
- (xviii) Excreción es el proceso o procesos por los que se eliminan del organismo la sustancia administrada y sus metabolitos.

(xviii) Distribución es el proceso o procesos por los que la sustancia absorbida y sus metabolitos se reparten por el interior del organismo.

(xix) Metabolismo es el proceso o procesos por los que la sustancia administrada se modifica estructuralmente en el organismo por medio de reacciones tanto enzimáticas como de otro tipo.

B.I Toxicidad aguda, subcrónica (por administración continuada) y crónica

Los efectos tóxicos agudos y la toxicidad orgánica o sistémica de una sustancia pueden evaluarse mediante diversos ensayos de toxicidad (métodos B.1-B.5) a partir de los cuales, tras una dosis única, puede obtenerse una indicación previa de la toxicidad.

En función de la toxicidad de la sustancia, puede considerarse la realización de una prueba límite o la determinación completa de la DL₅₀, aunque en los estudios de inhalación no se especifica ninguna prueba límite, ya que no ha sido posible definir un solo valor límite de exposición por inhalación.

Debe prestarse atención a los métodos que utilizan el mínimo posible de animales y reducen su sufrimiento como, por ejemplo, los métodos de dosis fija (método B.1 bis) y de clase tóxica aguda (método B.1 ter). En las pruebas de nivel 1, un estudio realizado con una segunda especie puede complementar las conclusiones deducidas del primer estudio. En este caso, puede utilizarse un método de referencia o bien puede adaptarse el método a un número menor de animales.

El ensayo de toxicidad por administración continuada (métodos B.7, B.8 y B.9) incluye la evaluación de los efectos tóxicos derivados de la exposición repetida. Se insiste en la necesidad de realizar observaciones clínicas cuidadosas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. Estos ensayos deben contribuir a identificar los órganos diana de la toxicidad, así como las dosis tóxicas y las no tóxicas. Puede ser necesario realizar investigación complementaria en profundidad sobre estos aspectos mediante estudios a largo plazo (métodos B.26 a B.30 y B.31).

B.II Mutagenicidad y genotoxicidad

La mutagenicidad se refiere a la inducción de cambios transmisibles y permanentes en la cantidad o en la estructura del material genético de las células u organismos. Estos cambios, o mutaciones, pueden afectar a un solo gen o segmento génico, a un bloque de genes o a cromosomas completos. Los efectos sobre los cromosomas completos pueden ser estructurales o numéricos.

La actividad mutagénica de una sustancia, para la información de base, se evalúa mediante ensayos *in vitro* para detectar mutaciones génicas (puntuales) en bacterias (método B.13/14) o aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero (método B.10).

También son aceptables los métodos *in vivo* como, por ejemplo, el ensayo de micronúcleos (método B.12) o el análisis de la metafase de células de médula ósea (método B.11). No obstante, si no hay ninguna contraindicación, se prefieren claramente los métodos *in vitro*.

Para volúmenes de producción más elevados, o para hacer o seguir una evaluación del riesgo, pueden ser necesarios estudios adicionales a fin de investigar más sobre la mutagenicidad o establecer un cribado previo de la carcinogenicidad; estos estudios pueden utilizarse con diversos fines: confirmar resultados obtenidos en las pruebas básicas, investigar parámetros no estudiados en dichas pruebas básicas, o bien iniciar o ampliar estudios *in vivo*.

Para estos fines, los métodos B.15 a B.25 incluyen sistemas eucarióticos tanto *in vivo* como *in vitro* y una gama ampliada de parámetros biológicos. Estas pruebas proporcionan información sobre mutaciones puntuales y otros parámetros en organismos más complejos que las bacterias utilizadas en el conjunto básico.

Como principio general, cuando se considere un programa de estudios complementarios de mutagenicidad, éste deberá elaborarse de forma que proporcione información adicional pertinente sobre el potencial mutagénico o carcinogénico de la sustancia estudiada.

Los estudios concretos más adecuados para un caso específico dependen de muchos factores, como las características químicas y físicas de la sustancia, los resultados de los ensayos iniciales bacterianos y citogénicos, el perfil metabólico de la sustancia, los resultados de otros estudios de toxicidad y los usos conocidos de la sustancia. En consecuencia, no es apropiado aplicar un esquema rígido para la selección de los ensayos, dada la variedad de factores que puede ser necesario considerar.

El Real Decreto 363/95 establece algunos principios generales sobre la selección de los ensayos, y en el documento de orientación técnica sobre evaluación del riesgo pueden encontrarse enfoques claros sobre los ensayos, aunque de todas formas es flexible y puede adaptarse según convenga a las circunstancias específicas.

No obstante, a continuación se agrupan los métodos de investigación complementaria, según su principal parámetro genético.

Estudios para investigar mutaciones génicas (puntuales)

- a) Estudios sobre mutaciones directas o revertidas en microorganismos eucarióticos (*Saccharomyces cerevisiae*) (método B.15)
- b) Estudios *in vitro* para investigar mutaciones directas en células de mamífero (Método B.17)
- c) Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*. (Método B.20)
- d) Ensayo de mutaciones en células somáticas *in vivo*, prueba de la mancha en ratón (Método B.24)

Estudios para investigar aberraciones cromosómicas

- a) Estudios citogenéticos *in vivo* en mamíferos; el análisis *in vivo* de las células en metafase de médula ósea debe considerarse si no se había incluido en la evaluación inicial (método B.11). Además, puede investigarse la citogenética de las células germinativas *in vivo* (método B.23)
- b) Estudios citogenéticos *in vitro* en células de mamíferos, si no se habían incluido en la evaluación inicial (método B.16)
- c) Estudios de letalidad dominante en roedores (método B.22)
- d) Ensayo de translocación hereditaria en ratón (método B.25)

Efectos genotóxicos efectos sobre el ADN

Las lesiones inducidas en el ADN sin pruebas directas de mutación pueden indicar genotoxicidad (efectos potencialmente nocivos sobre el material genético no asociados necesariamente con mutagenicidad). Para esta investigación pueden ser apropiados los siguientes métodos con microorganismos eucarióticos o células de mamífero:

- a) Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae* (método B.16)
- b) Lesión y reparación del ADN: síntesis de ADN no programada en células de mamífero *in vitro* (método B.18)
- c) Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero *in vitro* (método B.19).

Métodos alternativos para investigar la capacidad carcinogénica

Hay ensayos de transformación de células de mamífero *in vivo* que miden la capacidad de una sustancia para inducir cambios morfológicos y de comportamiento en los cultivos celulares, cambios que se consideran asociados con la transformación maligna (método B.21). Pueden utilizarse distintos tipos de células y diversos criterios de transformación.

Evaluación del riesgo de efectos hereditarios en mamíferos

Se dispone de métodos que pueden medir los efectos hereditarios en mamíferos completos producidos por mutaciones génicas (puntuales) como, por ejemplo, la prueba del locus específico del ratón, para medir la mutación de células germinales en la primera generación (no incluida en el presente Anexo), o las aberraciones cromosómicas como, por ejemplo, la prueba de translocación hereditaria en ratón (método B.23). Tales métodos pueden utilizarse cuando se evalúe el posible riesgo genético de una sustancia para el hombre. No obstante, dada la complejidad de estos ensayos y el elevadísimo número de animales necesarios, sobre todo para la prueba del locus específico, es necesario tener una sólida justificación antes de emprender dichos ensayos.

B.III Carcinogenicidad

Los productos carcinógenos pueden clasificarse como genotóxicos o no genotóxicos, según el mecanismo supuesto de acción.

A partir de los resultados de los estudios sobre mutagenicidad y genotoxicidad se puede obtener una información previa del potencial carcinogénico genotóxico. Puede obtenerse información complementaria a partir de los ensayos de toxicidad por administración continuada (subcrónica) o crónica. La prueba de toxicidad por

administración continuada (método B.7) y los estudios de administración continuada durante más tiempo incluyen la evaluación de los cambios histopatológicos observados en los ensayos de toxicidad por administración continuada como, por ejemplo, la hipertrofia en ciertos tejidos de posible importancia. Estos estudios y la información sobre toxicocinética pueden ayudar a detectar los productos químicos que presenten potencial carcinogénico, y que pueden requerir más estudios en profundidad sobre este aspecto, en un ensayo de carcinógenesis (método B.32) o, frecuentemente, en un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinógenesis (método B.33).

B.IV Toxicidad para la reproducción

La toxicidad para la reproducción puede detectarse de formas diferentes como, por ejemplo, alteraciones de las funciones o capacidades reproductoras masculina y femenina (efectos sobre la fertilidad), o inducción de efectos nocivos no hereditarios sobre la prole (toxicidad para el desarrollo), entre los que se incluyen también la teratogenicidad y los efectos durante la lactancia.

Respecto a los estudios de teratogenicidad, como parte de los ensayos de toxicidad para el desarrollo, el método de ensayo B.31 se centra principalmente en la administración por vía oral. De forma alternativa pueden utilizarse otras vías, en función de las propiedades físicas de la sustancia estudiada o de la vía probable de exposición de los seres humanos. En tales casos, el método de ensayo debe adaptarse de forma adecuada, teniendo en cuenta los elementos pertinentes de los métodos de ensayo de 28 días.

Cuando sea necesario realizar un ensayo de reproducción (fertilidad) en tres generaciones, podrá ampliarse el método descrito para el ensayo de reproducción en dos generaciones (método B.35) para incluir una tercera generación.

B.V Neurotoxicidad

La neurotoxicidad puede detectarse de formas diferentes como, por ejemplo, cambios funcionales o cambios estructurales y bioquímicos en los sistemas nerviosos central o periférico. A partir de los ensayos de toxicidad aguda puede obtenerse una indicación preliminar de la presencia de neurotoxicidad. El ensayo de toxicidad por administración continuada (método B.7) incluye la evaluación de los efectos neurotoxicológicos, y se subraya la necesidad de realizar cuidadosamente observaciones clínicas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método debe ayudar a detectar los productos químicos que presenten potencial neurotóxico y que pueden requerir investigación complementaria en profundidad sobre este aspecto. Además, es importante considerar el potencial de las sustancias para producir efectos neurotóxicos específicos que pueden no detectarse en otros estudios de toxicidad. Por ejemplo, se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada y pueden evaluarse con los métodos B.37 y B.38, tras exposición única o bien tras administración continuada.

B.VI Inmunotoxicidad

La inmunotoxicidad puede detectarse de formas diferentes como, por ejemplo, inmunosupresión o aumento de la capacidad de respuesta del sistema inmunitario que produce hipersensibilidad o autoinmunidad inducida. El ensayo de toxicidad por administración continuada (método B.7) incluye la evaluación de los efectos inmunotóxicos. El método debe ayudar a detectar los productos químicos que presenten potencial inmunotóxico, y que pueden requerir investigación adicional en profundidad sobre este aspecto.

B.VII Toxicocinética

Los estudios de toxicocinética ayudan a interpretar y evaluar los datos de toxicidad. Estos estudios van enfocados a aclarar aspectos determinados de la toxicidad de la sustancia química objeto de estudio, y sus resultados pueden ayudar a idear estudios de toxicidad ulteriores. No se contempla la necesidad de determinar en cada caso todos los parámetros. Sólo en casos esporádicos será preciso realizar toda la secuencia de estudios de toxicocinética (absorción, excreción, distribución y metabolismo). En el caso de determinados compuestos, tal vez sea oportuno hacer cambios en esta secuencia, o bien un estudio de dosis única (método B.36).

La información sobre la estructura química y las propiedades fisicoquímicas pueden dar también una idea de las características de absorción por la vía prevista de administración y las posibilidades de metabolización y distribución tisular. También puede haber información sobre parámetros toxicocinéticos procedente de estudios anteriores de toxicidad y toxicocinética.

C. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Antes de iniciar cualquier estudio de toxicidad debe conocerse la composición de la sustancia de ensayo, con inclusión de las impurezas principales, y sus propiedades fisicoquímicas pertinentes, incluida la estabilidad.

- El número de animales utilizados se reduce al mínimo científicamente aceptable; solamente se someten a este ensayo 5 animales del mismo sexo por nivel de dosis en los métodos B.1 y B.3; solamente se utilizan 10 animales (y sólo 5 en el grupo de control negativo) para la determinación de la sensibilización de la piel en el ensayo de maximización en cobaya (método B.6); se reduce también el número de animales que se necesitan para el control positivo cuando se estudia la mutagenicidad *in vivo* (métodos B.11 y B.12).
 - Se reducen al mínimo el dolor y el sufrimiento de los animales durante los ensayos; puede ser preciso sacrificar de forma compasiva a los animales que muestren signos intensos y continuados de dolor y sufrimiento; no es preciso administrar sustancias de ensayo de una forma determinada cuando se sepa que de esta forma se provoca intenso dolor y sufrimiento debido a las propiedades corrosivas o irritantes de la sustancia (métodos B.1, B.2 y B.3).
 - Se evita la realización de ensayos con dosis innecesariamente altas mediante la introducción de ensayos límite, no sólo en los ensayos de toxicidad aguda (métodos B.1, B.2 y B.3) sino también en los ensayos *in vivo* de mutagenicidad (métodos B.11 y B.12).
 - Una estrategia actual de ensayos para examinar la irritación permite no realizar un ensayo, o reducirlo a un ensayo con un solo animal, si se pueden proporcionar pruebas científicas suficientes.
- Dichas pruebas científicas pueden basarse en las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, en los resultados de otros ensayos previamente realizados, o en los resultados de ensayos *in vitro* bien validados. Por ejemplo, si se ha llevado a cabo un estudio de toxicidad aguda por vía dérmica con la dosis del ensayo límite de la sustancia (método B.3) y no se ha observado irritación de la piel, puede no ser necesario seguir estudiando la irritación cutánea (método B.4); las sustancias que hayan mostrado capacidad de corrosión evidente o irritación grave de la piel en un estudio de irritación cutánea (método B.4) no deben someterse posteriormente a ensayos de irritación ocular (método B.5).

F. ENSAYOS ALTERNATIVOS

Constituye un objetivo científico de la Unión Europea la elaboración y validación de técnicas alternativas que puedan proporcionar el mismo nivel de información que los actuales ensayos con animales, pero utilizando menos animales, provocando menos sufrimiento o evitando completamente el uso de animales.

Tales métodos, según vayan existiendo, deben tenerse en cuenta siempre que sea posible para la caracterización de riesgos y la correspondiente clasificación y etiquetado en función de los riesgos intrínsecos.

G. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

A la hora de evaluar e interpretar los ensayos, deben tenerse en cuenta las limitaciones de la extrapolación directa al hombre de los resultados de los estudios realizados *in vitro* o con animales y, en consecuencia, deben utilizarse pruebas de la aparición de efectos adversos en personas, siempre que sea posible, a fin de confirmar los resultados de los ensayos.

Estos resultados pueden utilizarse para la clasificación y el etiquetado de los productos químicos, nuevos y existentes, respecto a sus efectos sobre la salud humana, en función de sus propiedades intrínsecas, observadas y cuantificadas por estos métodos. Los criterios correspondientes del Anexo VI de clasificación y etiquetado también hacen referencia a los parámetros de los protocolos incluidos en estos métodos de ensayo.

Estos resultados pueden utilizarse también en los estudios de evaluación del riesgo de productos químicos nuevos y existentes. En los documentos correspondientes de orientación se indican las estrategias apropiadas de ensayo con estos fines.

H. BIBLIOGRAFÍA

La mayoría de estos métodos se han elaborado en el marco del programa de la OCDE de líneas directrices de ensayo, y deben realizarse de conformidad con los principios de buenas prácticas de laboratorio, a fin de garantizar la "aceptación mutua de datos" lo más amplia posible.

Puede encontrarse información adicional en las referencias que se dan en las directrices de la OCDE y en otras publicaciones relacionadas.

Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de ensayo proporcionan datos importantes para la selección de la vía de administración, el diseño de cada estudio particular y el manejo y almacenamiento de la sustancia.

Antes de iniciarse el estudio debe desarrollarse un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sustancia de ensayo (con inclusión de sus principales impurezas, siempre que sea posible) en el medio de administración y en el material biológico.

Debe incluirse en el informe del ensayo toda la información a la identificación, propiedades fisicoquímicas, pureza y comportamiento de la sustancia estudiada.

D. CUIDADOS DE LOS ANIMALES

En los estudios de toxicidad es fundamental controlar de forma estricta las condiciones ambientales y aplicar técnicas adecuadas de cuidado de los animales.

(i) Condiciones de alojamiento

Las condiciones ambientales de los locales o recintos destinados a los animales de experimentación deben ser adecuadas para la especie que se utilice. Para ratas, ratones y cobayas, la temperatura del local debe ser de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 30 al 70%; para los conejos, la temperatura debe ser de $20 \pm 3^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 30 al 70%.

Algunas técnicas experimentales son particularmente sensibles a los efectos de la temperatura; en tales casos, en la descripción del método de ensayo se incluyen indicaciones detalladas sobre las condiciones apropiadas. En todas las investigaciones sobre efectos tóxicos deben medirse y registrarse la temperatura y la humedad, y estos parámetros deben consignarse en el informe final del estudio.

La iluminación debe ser artificial, con una alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los datos relativos al programa de alumbrado deberán registrarse y consignarse en el informe final del estudio.

Salvo que el método contenga alguna indicación en contra, los animales se alojarán individualmente, o estarán en jaulas de pequeños grupos del mismo sexo. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de 5 animales en cada jaula.

En los informes sobre los experimentos con animales, es importante indicar el tipo de jaula utilizada, así como el número de animales alojados en cada una, tanto durante la exposición a la sustancia química como durante el período posterior de observación.

(ii) Condiciones de alimentación

La dieta debe cubrir todas las necesidades nutricionales de la especie sometida a experimentación. Cuando se incorporen sustancias de ensayo a la dieta de los animales, el valor nutricional puede verse reducido por interacciones entre la sustancia y algún componente de la dieta. A la hora de interpretar los resultados de los ensayos debe estudiarse la posibilidad de que se dé una interacción de este tipo. Pueden utilizarse dietas convencionales de laboratorio junto con un aporte limitado de agua potable. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia estudiada si se administra por este método.

Ningún contaminante de la dieta con influencia conocida sobre la toxicidad podrá estar presente en concentraciones que puedan interferir.

E. BIENESTAR DE LOS ANIMALES

Se prestará la debida consideración al bienestar de los animales cuando se elaboren los métodos de ensayo. A continuación se dan algunos breves ejemplos, sin que la lista sea exhaustiva. Los términos exactos o las condiciones precisas se encontrarán en el texto de los métodos.

— Para la determinación de la toxicidad oral aguda, deben considerarse dos métodos alternativos, el "método de dosis fija" y el "método de clase tóxica aguda". El "método de dosis fija" no utiliza la muerte como parámetro específico y exige menos animales. El "método de clase tóxica aguda" emplea como media un 70% menos de animales que el método B.1 para la toxicidad oral aguda. Cualquiera de estos métodos alternativos producen menos dolor y sufrimiento que la metodología clásica.

ANEXO B

PARTE II

Texto que se inserta después del Capítulo B.1. bis del Anexo V, del Reglamento.

B.1.ter TOXICIDAD AGUDA (ORAL): METODO DE CLASE TÓXICA AGUDA

1. METODO

1.1. Introducción

El método de clase tóxica aguda proporciona información destinada tanto a la evaluación de los riesgos como a su clasificación.

El método emplea tres dosis fijas, separadas de forma conveniente para permitir la clasificación del compuesto a partir de los resultados del estudio. Además, el procedimiento descrito en el presente método de ensayo permite la selección de tres dosis fijas adicionales, que pueden utilizarse como alternativas en alguna fase determinada o como opciones de ensayos complementarios. El uso de dosis adicionales puede considerarse en caso de que se desee o se necesite afinar más.

El método utiliza dosis iniciales definidas y con él no se pretende calcular una DL_{50} precisa, sino determinar una gama de exposición en la que puede esperarse la aparición de letalidad, ya que la muerte de una parte de los animales sigue siendo su parámetro principal. Los resultados del ensayo deben permitir la clasificación con arreglo a los criterios del Anexo VI. Debido a la naturaleza secuencial del enfoque, la duración del ensayo puede ser superior a la del procedimiento descrito en el método B.1. La ventaja principal del presente método consiste en que requiere un número menor de animales que el método de toxicidad aguda (oral) (B.1) o el método alternativo de dosis fija (B.1 bis).

Véase también la introducción general de la Parte B.

1.2. Definiciones

Véase la introducción general de la Parte B.

1.3. Principio del método

La sustancia se administra por vía oral a un grupo de animales de experimentación a una de las dosis definidas. La sustancia se somete a ensayo según un procedimiento por fases, utilizándose en cada fase tres animales del mismo sexo. No es necesario realizar un estudio previo de observación. Según la ausencia o presencia de mortalidad de los animales en relación con la sustancia recibida en una fase determinada se decidirá cuál es la fase siguiente, es decir:

- no es necesario seguir con el ensayo
- la fase siguiente se realizará con la misma dosis, pero con animales del otro sexo
- la siguiente fase se realizará con la siguiente dosis superior o inferior.

1.4. Descripción del método

1.4.1. Preparación

Se seleccionan al azar animales jóvenes sanos, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes del inicio del estudio, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupadas por sexo y dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstruir la realización de observaciones claras de cada animal.

La sustancia estudiada se administra en una sola dosis a los animales directamente con sonda gástrica o cándula adecuada de intubación.

En caso necesario, la sustancia estudiada se disolverá o suspenderá en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, se considere en primer lugar la utilización de una suspensión o solución acuosa, después una solución o emulsión en aceite (por ejemplo, aceite de maíz) y, finalmente, la disolución en otros vehículos. En caso de vehículos no acuosos, deben conocerse las características toxicas del vehículo y, si se desconocen, deberán determinarse antes de realizar el ensayo.

Los animales se mantienen en ayuno antes de la administración (por ejemplo, desde el día anterior en el caso de la rata, o durante tres o cuatro horas en el caso del ratón). No debe retirarse el agua.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Animales de laboratorio

A no ser que existan contraindicaciones, la especie preferida de roedor es la rata. Las hembras serán nulíparas y no grávidas.

Al inicio del estudio, la variación en peso de los animales será mínima y no superará el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.4.2.2. Número y sexo

Se utilizan en cada fase tres animales de un mismo sexo. En la fase inicial puede utilizarse cualquiera de los dos sexos.

1.4.2.3. Dosis

La dosis inicial se seleccionará entre las tres dosis fijas, es decir, 25, 200 y 2 000 mg/kg de peso corporal. La dosis inicial será la que produzca con mayor probabilidad mortalidad de al menos uno de los animales a los que se administre. Podrá utilizarse uno de los diagramas de flujo de los procedimientos descritos en el Anexo I, en función de la dosis inicial.

Para seleccionar el sexo y la dosis inicial deberá evaluarse toda la información disponible, incluida la información sobre la relación estructura-actividad. Cuando la información sugiera que no es probable la aparición de mortalidad con la dosis máxima (2 000 mg/kg peso corporal), se realizará una prueba límite. Si no hay información sobre una sustancia estudiada, se recomendará utilizar, por razones de bienestar de los animales, como dosis inicial 200 mg/kg peso corporal.

A veces puede desearse tener una información más detallada de lo que sería posible obtener tras realizar el ensayo con las tres dosis fijas 25, 200 y 2 000 mg/kg peso corporal. En estos casos, puede considerarse la posibilidad de realizar pruebas complementarias con las dosis fijas adicionales de 5, 50 o 300 mg/kg peso corporal.

No será necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados, debido a sus acciones corrosivas o gravemente irritantes.

El intervalo de tiempo entre los grupos de tratamiento se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de animales del otro sexo, o con la dosis siguiente, no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados.

1.4.2.4. Ensayo límite

Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 2 000 mg/kg peso corporal con tres animales de cada sexo. Si aparece mortalidad debida a la sustancia, puede ser necesario realizar una prueba complementaria con 200 (o 500) mg/kg de peso corporal.

1.4.2.5. Periodo de observación

Los animales deben someterse a observación durante 14 días en principio, salvo los que se encuentran muertos o sea necesario eliminar del estudio y sacrificar de forma compasiva por razones de bienestar animal. No obstante, la duración del periodo de observación no debe fijarse

2.

de forma rígida, sino que debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

1.4.3. Procedimiento

Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada esta sustancia, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 ó 4 horas. Cuando una dosis se administre en fracciones a lo largo de un período, podrá ser necesario proporcionar a los animales alimento y agua, en función de la duración del período.

El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una vez depende del tamaño del animal utilizado. En el caso de los roedores, el volumen no debe superar en principio 1 ml/100 g de peso corporal; no obstante, en el caso de las soluciones acuosas puede considerarse la posibilidad de administrar 2 ml/100 g de peso corporal. La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Si no es posible utilizar una dosis única, podrá administrarse la sustancia en fracciones menores a lo largo de un período que no exceda de 24 horas.

En el Anexo 1 se dan detalles del procedimiento del ensayo.

1.4.3.1. Observaciones generales

Deben hacerse observaciones clínicas cuidadosas el menos dos veces en el día de administración, o con mayor frecuencia si así lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y posteriormente al menos una vez al día. Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso y signos de sufrimiento continuo deberán sacrificarse de forma compasiva. Los animales sacrificados por razones compasivas se considerarán de la misma forma que los animales que hayan muerto durante la prueba.

Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte. Será necesario proceder a observaciones adicionales si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma.

Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

1.4.3.2. Peso corporal

Todos los animales se pesarán justo antes de la administración de la sustancia, y después al menos una vez por semana. Se calcularán y registrarán los cambios de peso. Al final de la prueba, los animales supervivientes se pesarán antes de sacrificarse de forma compasiva.

1.4.3.3. Necropsia macroscópica

Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio, se someterán a necropsia macroscópica. Se registrarán los cambios patológicos macroscópicos de cada animal. Podrá considerarse también la realización del examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica, en los animales que sobrevivan un mínimo de 24 horas, ya que este examen puede proporcionar información útil.

RESULTADOS

Deben proporcionarse los resultados de cada animal por separado. Además, se reunirán todos los resultados en forma de un cuadro que presente para cada grupo de ensayo el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, una descripción de la evolución temporal de los efectos tóxicos y su reversibilidad, y las observaciones hechas durante la necropsia.

En el Anexo 2 se dan unas orientaciones generales sobre la interpretación de los resultados con vistas a la clasificación.

INFORME

Informe del ensayo

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

Animales de ensayo:

- especie/variedad
- situación microbiológica de los animales, cuando se conozca
- número, edad y sexo de los animales
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- peso de cada animal al inicio del ensayo, a intervalos semanales durante el ensayo, y al final de éste.

Condiciones del ensayo:

- justificación de la elección del vehículo, en caso de que no sea agua
- datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración
- datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluidos su tipo y origen)
- justificación de la elección de la dosis inicial.

Resultados:

- tabulación de los datos de las repuestas por sexo y dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad, naturaleza, gravedad y duración de los efectos)
- cronología de la aparición de signos de toxicidad y si éstos son reversibles en cada animal
- observaciones de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Discusión de los resultados

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

El presente método es análogo a la TG 423 de la OECD.

ANEXO 1

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Como se indica en el punto 1.4.2.3, la dosis inicial debe ser la que probablemente produzca mortalidad en al menos uno de los animales a que se administre. Para seleccionar estas dosis inicial puede utilizarse la siguiente información:

- datos sobre las propiedades fisicoquímicas
- relación estructura-actividad
- todos los datos procedentes de otras pruebas de toxicidad
- uso previsto de la sustancia estudiada.

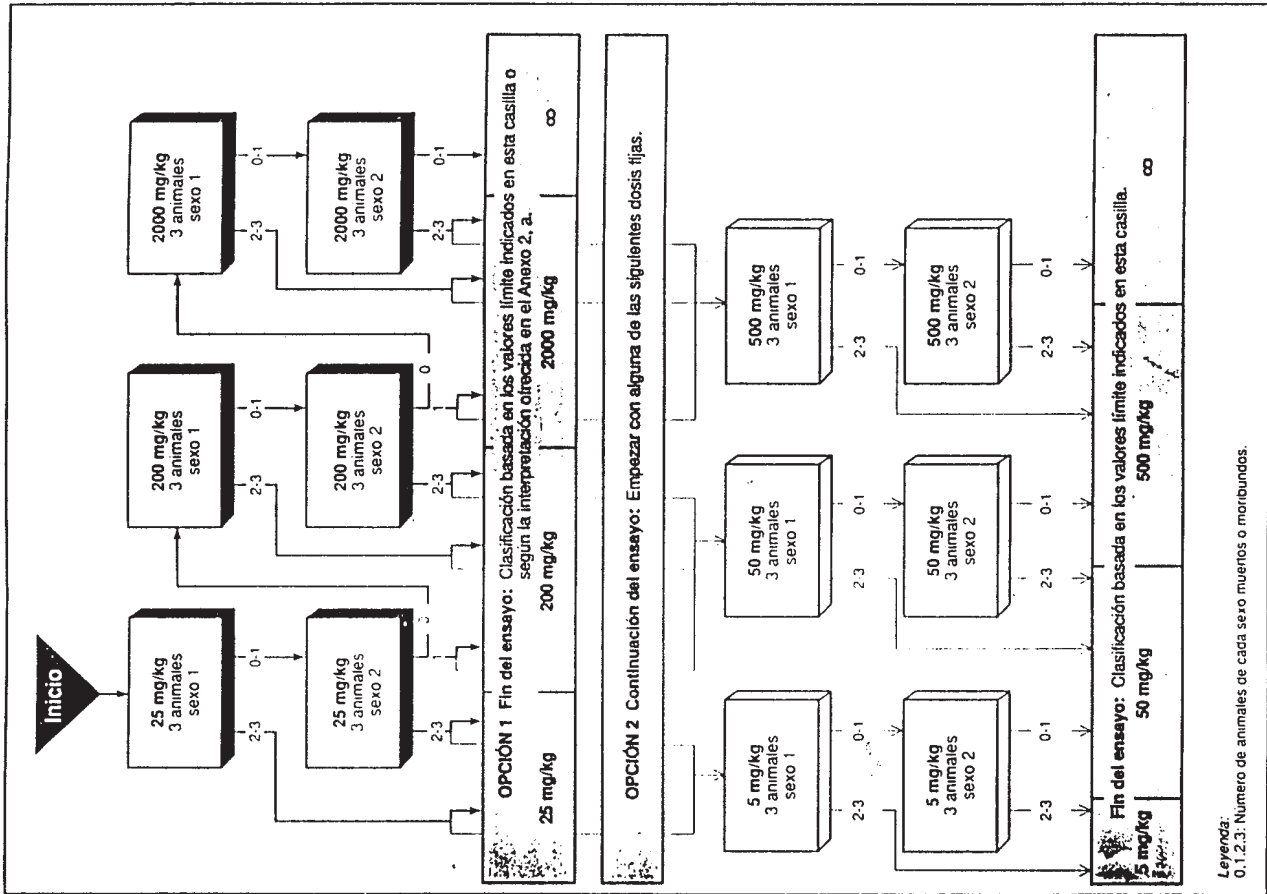
2. Para cada dosis inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo, incluidos en el presente Anexo. En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

3. Cuando con una dosis inicial de 25 ó 200 mg/kg de peso corporal sólo muera un animal del segundo sexo, normalmente no hay que continuar con el ensayo. No obstante, si no se observa ningún signo tóxico en los otros cinco animales, durante la autopsia debe considerarse la posibilidad de que la mortalidad no se haya debido a la sustancia. En tal caso, el ensayo debe continuar con una dosis del siguiente nivel superior.

4. Cuando con la dosis de 2 000 mg/kg de peso corporal muera un solo animal por sexo, se supone que la DL_{50} supera los 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, dado que se trata de un resultado límite, la respuesta de los otros dos animales de cada sexo debe estudiarse cuidadosamente, y la aparición de signos tóxicos inconfundibles y marcados en estos animales puede hacer que la clasificación corresponda a una DL_{50} de 2 000 mg/kg de peso corporal o menos, o puede justificar la necesidad de continuar los ensayos con este mismo nivel.

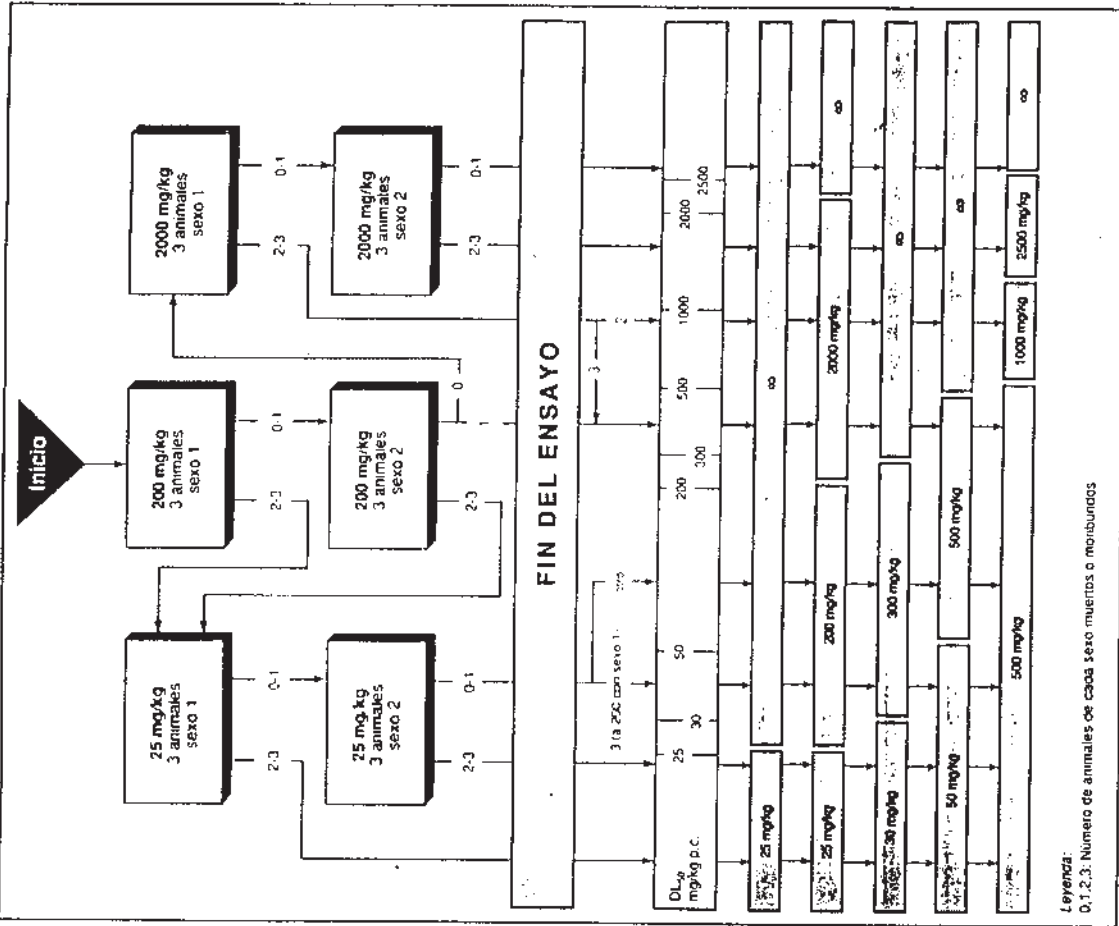
5. El procedimiento permite la realización de ensayos con tres dosis fijas adicionales (opción 2). Esta opción puede utilizarse bien para seleccionar una dosis alternativa en un punto dado del proceso, o bien para realizar ensayos complementarios una vez terminado el ensayo en sí (opción 1). En la opción 1, el procedimiento de ensayo se indica con flechas en negrita, mientras que para la opción 2 el procedimiento de ensayo sigue las flechas finas.

a) Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 25 mg/kg de peso corporal



b) Interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo con la opción 1

Dosis inicial: 200 mg/kg de peso corporal

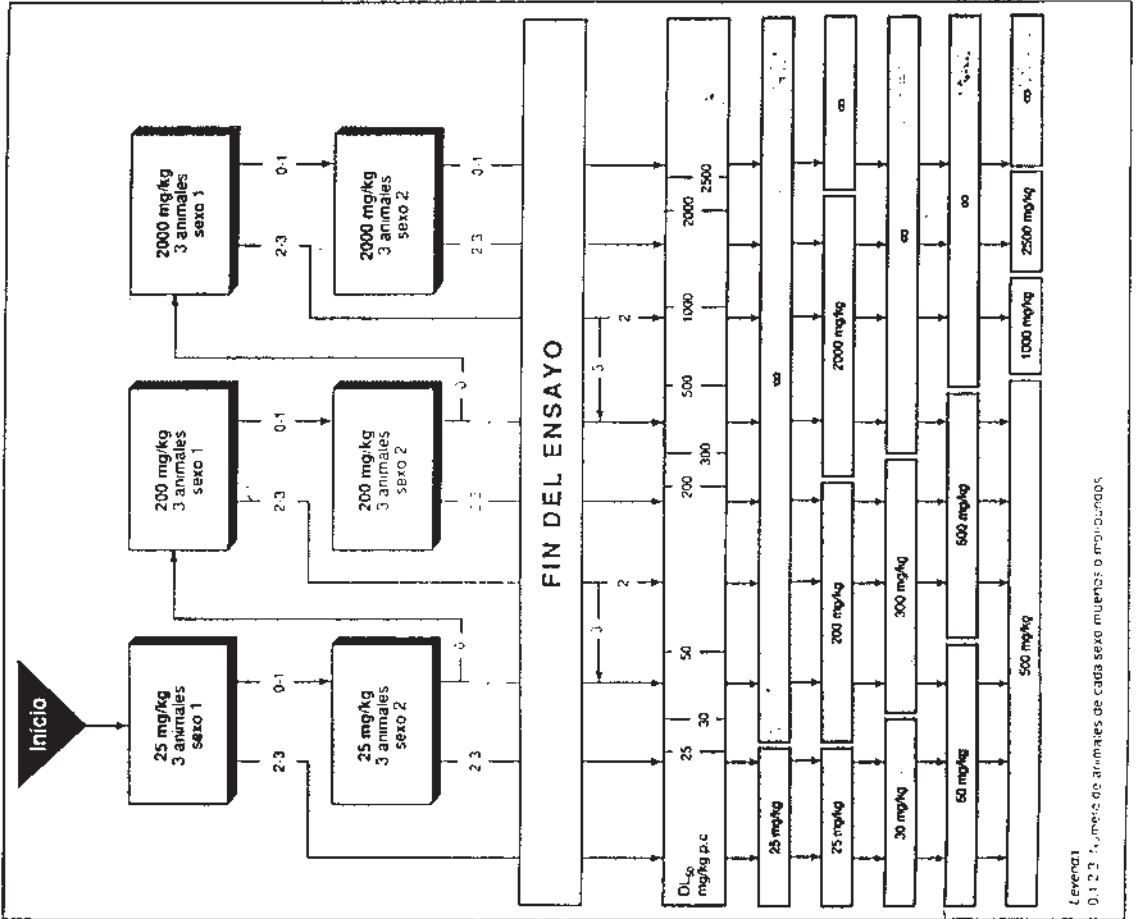


ANEXO 2
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO CON LA OPCIÓN 1

Las casillas sombreadas debajo de la casilla de «Fin del ensayo» en los esquemas del presente Anexo representan valores límites para la clarificación. Según el procedimiento de ensayo expuesto en la opción 1, debe seguirse hacia abajo la flecha adecuada, hasta llegar a la casilla sombreada correspondiente.

a) Interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo con la opción 1

Dosis inicial: 25 mg/kg de peso corporal



ANEXO B
PARTE III

Texto que sustituye al Capítulo B.6, del Anexo V, del Reglamento.

B.6. SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL

MÉTODO

1. Introducción

Obtenciones:

La sensibilidad y capacidad de los ensayos para detectar sustancias que pueden sensibilizar la piel humana se considerará importantes para un sistema de clasificación de la toxicidad aplicable a la salud pública

No hay un método único que detecte todas las sustancias con potencial de sensibilización de la piel humana y que sea adecuado para todas las sustancias.

Para seleccionar un ensayo deben tenerse en cuenta factores como las características físicas de la sustancia, incluyendo su capacidad de penetración en la piel.

Se han elaborado dos tipos de ensayos que utilizan cobayas: los ensayos con coadyuvante, en los que se potencia un estado alérgico disolviendo o suspendiendo la sustancia estudiada en coadyuvante completo de Freund (FCA), y los ensayos sin coadyuvante.

Es probable que los ensayos con coadyuvante sean más exactos a la hora de predecir el efecto sensibilizante probable de una sustancia en la piel humana respecto a los métodos que no emplean el coadyuvante completo de Freund, por lo que son los métodos preferidos.

El ensayo de maximización en cobaya (GMPT) es un ensayo con coadyuvante ampliamente utilizado. Aunque se pueden utilizar otros métodos para detectar el potencial sensibilizante de una sustancia, se considera que el GMPT es la técnica con coadyuvante de preferencia.

Los ensayos sin coadyuvantes suele utilizarse sobre todo el ensayo de Buehler) se consideran menos sensibles con muchas clases de productos químicos.

En ciertos casos puede haber buenas razones para escoger el ensayo de Buehler, que supone una aplicación tópica en vez de la inyección intradérmica utilizada en el ensayo de maximización en cobaya. Cuando se use el ensayo de Buehler deberá justificarse científicamente.

En el presente método se describen el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler. Se pueden utilizar otros métodos siempre que estén bien validados y se dé su justificación científica.

Si se obtiene un resultado positivo en un ensayo de cribado reconocido, podrá designarse una sustancia de ensayo como sensibilizante potencial y podrá no ser necesario realizar un nuevo ensayo con cobaya. No obstante, si se obtiene un resultado negativo en un ensayo semejante, deberá realizarse un ensayo con cobaya utilizando el procedimiento descrito en este método de ensayo.

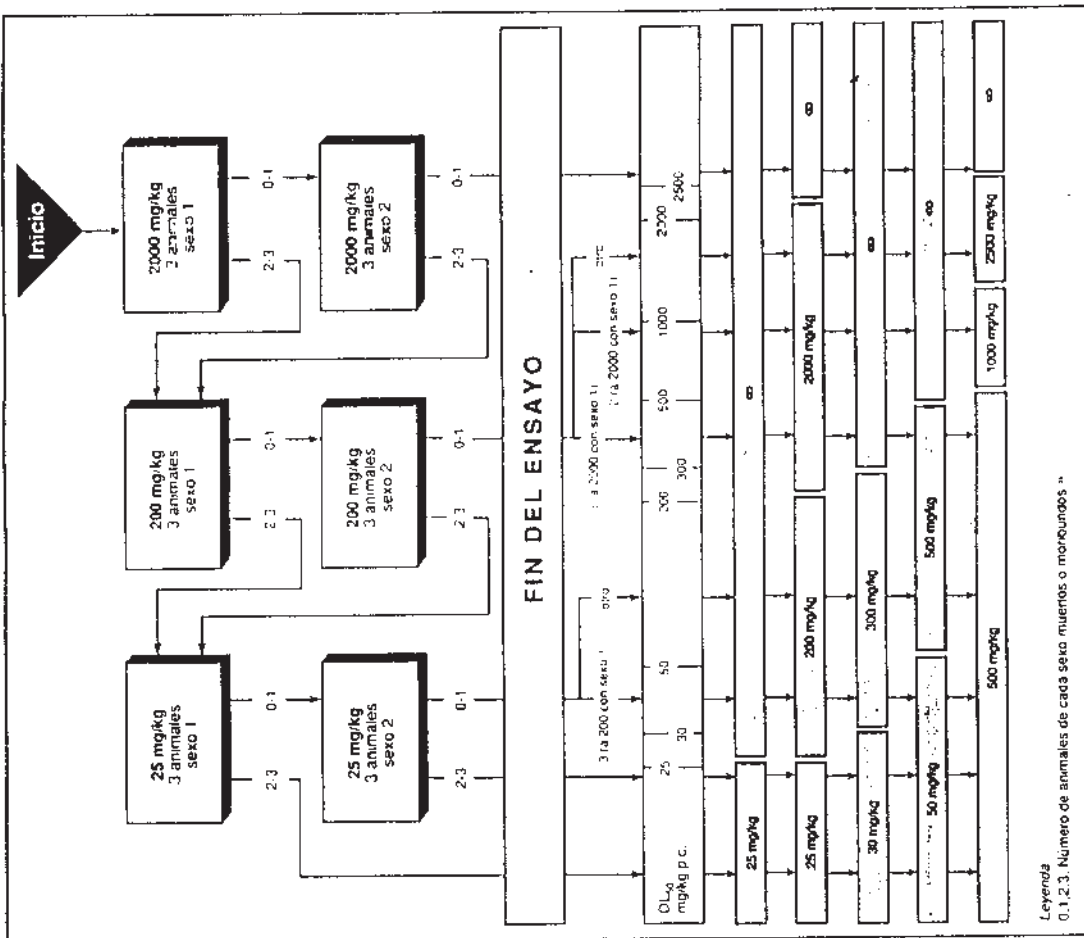
Véase también la introducción general de la parte B.

Definiciones

Sensibilización de la piel (dermatitis alérgicas de contacto): es una reacción cutánea de origen inmunológico ante una sustancia. En los seres humanos las respuestas pueden caracterizarse por prurito, eritema, edema, pápulas, vesículas, ampollas o una combinación de estos fenómenos. En otros especies, las reacciones pueden ser diferentes y apreciarse solo eritema y edema.

c) Interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo con la opción 1

Dosis inicial: 2 000 mg/kg de peso corpora



Exposición de inducción: exposición experimental de un sujeto a una sustancia con el fin de inducir un estado de hipersensibilidad.
Período de inducción: período de al menos una semana a partir de la exposición de inducción, durante el cual puede aparecer un estado de hipersensibilidad.

Exposición de provocation: exposición experimental de un sujeto previamente tratado a una sustancia después de un período de inducción, a fin de determinar si el sujeto reacciona de forma hipersensible.

1.3. **Sustancias de referencia**

La sensibilidad y fiabilidad de la técnica experimental utilizada deberá evaluarse cada seis meses mediante el empleo de sustancias conocidas como oclmosenibilizantes suaves o moderadas.

En un ensayo realizado convenientemente, el empleo de un sensibilizante suave o moderado debe producir una respuesta del 30 % al menos en un ensayo con coadyuvante y del 15 % al menos en un ensayo sin coadyuvante.

Se recomiendan las siguientes sustancias:

| Número CAS | Número EINECS | Denominación EINECS | Denominación común |
|------------|---------------|---|-------------------------------|
| 101-86-0 | 202-983-3 | α -hexilcinnamaldehído | α -hexilcinnamaldehído |
| 149-30-4 | 205-736-8 | benzotiazol-2-ol (mercaptoben-zotiazol) | kaptax |
| 94-09-7 | 202-303-5 | benzocaina | norcaina |

En ciertas circunstancias se podrán utilizar otras sustancias de control que cumplan los criterios citados, justificándose debidamente su elección.

1.4. **Principio del método**

Los animales utilizados se exponen inicialmente a la sustancia mediante inyecciones intradérmicas o aplicación epidérmica (exposición de inducción). Tras un período de descanso de 3 a 14 días (período de inducción), durante el que puede desarrollarse la respuesta inmunitaria, los animales se someten a una dosis de provocation. La amplitud y el grado de la reacción cutánea de los animales ante la exposición de provocation se compara con la mostrada por animales de control que reciben un tratamiento simulado durante la inducción y se someten a la exposición de provocation.

1.5. **Descripción de los métodos**

Si se considera necesario eliminar la sustancia estudiada, puede hacerse utilizando agua o un disolvente adecuado que no altere la respuesta obtenida en la integridad de la epidérmis.

1.5.1. **Prueba de maximización en cobaya (GPMT)**

1.5.1.1. **Preparación**

Durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinos jóvenes y sanos. Antes del ensayo, los animales se eligen al azar y se asignan a los lotes de tratamiento. La eliminación del pelo se hace por cont. afeitado o incluso depilación química, en función del método de ensayo utilizado. Debe evitarse la producción de escoriaciones en la piel. Los animales se pesan antes del ensayo y al final del mismo.

1.5.1.2. **Condiciones del ensayo**
 1.5.1.2.1. **Animales de laboratorio**
 Se utilizan cepas comunes de laboratorio de cobaya albino.

1.5.1.2.2. **Número y sexo**
 Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deben ser nulíparas y no grávidas.

Se utilizan por los menos 10 animales para el lote tratado y, por lo menos, 5 para el lote testigo. Si se utilizan menos de 20 animales tratados y 10 testigos, y no es posible concluir que la sustancia estudiada sea sensibilizante, se recomienda con insistencia realizar ensayos complementarios con otros animales hasta completar un mínimo de 20 cobayas tratadas y 10 cobayas testigos.

1.5.1.2.3. **Dosis**
 La concentración de la sustancia utilizada para cada exposición de inducción debe tolerarse bien sistemáticamente y debe ser la más elevada que produzca irritación cutánea suave o moderada. La concentración utilizada para la exposición de provocation debe ser la mayor dosis no irritante. Si necesario, las concentraciones apropiadas pueden ser determinadas a partir de un estudio piloto en el que se utilicen dos a tres animales. Debe considerarse la posibilidad de utilizar con este fin animales tratados con FCA.

1.5.1.3. **Procedimiento**
 1.5.1.3.1. **Inducción**

Día 0: lote tratado
 Se administran tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en la región dorsal superior, de la que se habrá eliminado el pelo, de forma que a cada lado de la línea media quede una inyección de cada par.

Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico
Inyección 2: la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, en la concentración seleccionada
Inyección 3: la sustancia de ensayo en la concentración seleccionada formulada en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico

En la inyección 3, las sustancias hidrosolubles se disuelven en la fase acuosa antes de mezclarse con el FCA. Las sustancias insolubles o insolubles se suspenden en la FCA antes de combinarse con la fase acuosa. La concentración final de la sustancia de ensayo será igual a la utilizada en la inyección 2.

Las inyecciones 1 y 2 se ponen en contacto entre sí y lo más cerca posible de la cabeza, mientras que la inyección 3 se aplica hacia la parte caudal de la superficie de ensayo.

Día 0: lote testigo
 Se ponen tres pares de inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en los mismos lugares que en los animales tratados.

Inyección 1: mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico
Inyección 2: vehículo solo
Inyección 3: formulación al 50 % (p/v) del vehículo en una mezcla 1:1 (v/v) FCA/agua o suero fisiológico.

Días 5-7: lotes tratados y testigo
 Aproximadamente 24 horas antes de la aplicación tópica de inducción, si la sustancia no es irritante de la piel, se trata la superficie de ensayo, previo corte al rape del pelo o afeitado del mismo, con 0,5 ml de lauri-sulfato sódico al 10 % en vaselina, a fin de producir irritación local.

- 1.5.2.2.2. Número y sexo**
Se pueden utilizar animales de ambos sexos. Si se utilizan hembras, deben ser nulíparas y no gravidas.
- Se utilizan por lo menos 20 animales para el lote tratado y, por lo menos, 10 animales para el lote testigo.
- 1.5.2.2.3. Dosis**
La concentración de sustancia de ensayo utilizada en cada exposición de inducción debe ser la más elevada posible que produzca una irritación suave pero no excesiva. La concentración utilizada para la exposición de provocación debe ser la mayor dosis no irritante. Si, necesariamente, las concentraciones apropiadas pueden ser determinadas a partir de un estudio piloto en el que se utilicen dos o tres animales.
- En caso de sustancias hidrosolubles, es conveniente utilizar agua o una solución diluida no irritante de un agente tensioactivo como vehículo. Para otros tipos de sustancias, se recomienda etanol/agua al 80 % para la inducción y acetona para la provocación.
- 1.5.2.3. Procedimiento**
- 1.5.2.3.1. Inducción**
Día 0: lote tratado
Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). El sistema del parche de ensayo debe cargarse totalmente con la sustancia en un vehículo adecuado (debe justificarse la elección del vehículo: las sustancias líquidas pueden aplicarse sin diluir, en caso de que sea conveniente). El sistema del parche de ensayo se aplica a la zona de ensayo y se mantiene en contacto con la piel mediante una cámara o parche oclusivo y un apósito adecuado durante 6 horas.
- El sistema del parche de ensayo debe ser oclusivo. Es apropiado utilizar una compresa de algodón, que puede ser circular o cuadrada, con una superficie aproximada de 4 a 6 cm². Se recomienda sujetarlo utilizando unas bridas adecuadas para garantizar la oclusión. Si se utiliza un envoltorio, puede ser necesario proceder a exposiciones complementarias.
- Día 0: lote testigo**
Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). Se aplica el vehículo solo de forma similar a la utilizada con el lote tratado. El sistema del parche de ensayo se mantiene en contacto con la piel mediante un parche oclusivo o cámara y un apósito adecuado durante 6 horas. Si puede demostrarse que no es necesario dar placebo al lote testigo, puede omitirse dicho tratamiento.
- Días 6-8 y 13-15: lotes tratado y testigo**
Se realiza la misma aplicación que en el día 0 en la misma superficie de ensayo (desprovista de pelo en caso necesario del mismo costado el día 6-8, y de nuevo el día 13-15).
- 1.5.2.3.2. Provocación**
Días 27-29: lotes tratado y testigo
Se elimina el pelo (mediante corte al rape) del costado no tratado de los animales tratados y testigos. Se aplica un parche oclusivo o cámara con la cantidad conveniente de sustancia, a la concentración máxima no irritante, a la parte posterior del costado sin tratar de los animales tratados y testigos.
- Quando sea pertinente, también se aplicará un parche oclusivo o cámara con vehículo solo a la parte anterior del costado sin tratar de los animales tratados y testigos. Los parches o cámaras se mantendrán con un apósito adecuado durante 6 horas.
- Días 6-8: lote tratado**
Se elimina el pelo de la superficie de ensayo. Se carga totalmente un papel de filtro (2 x 4 cm) con la sustancia de ensayo en un vehículo adecuado, se aplica a la superficie de ensayo y se mantiene con un apósito oclusivo durante 48 horas. La erección del vehículo debe justificarse. Los productos sólidos se pulverizan finamente y se incorporan a un vehículo adecuado. Los líquidos pueden aplicarse sin diluir, en caso de que esto sea apropiado.
- Días 6-8: lote testigo**
Se elimina el pelo de la superficie de ensayo. Solo se aplica el vehículo, de forma similar, en la superficie de ensayo con un apósito oclusivo durante 48 horas.
- 1.5.1.3.2. Provocación**
Días 20-22: lotes tratado y testigo
Se elimina el pelo de los costados de los animales tratados y de los testigos. Se aplica un parche o cámara con la sustancia estucada sobre un costado de los animales y, cuando sea pertinente, también se puede aplicar en el otro costado un parche o cámara con el vehículo solo. Los parches se mantienen con un apósito oclusivo durante 24 horas.
- 1.5.1.3.3. Observación y clasificación: lotes tratado y testigo**
— Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se limpia la superficie de ensayo y, en caso necesario, se elimina el pelo mediante corte al rape, atizado o depilación.
— Unas 3 horas después (hacia las 48 horas del inicio de la aplicación de provocación) se observa la reacción cutánea y se registra de acuerdo con la clasificación que se recoge en el apéndice.
— Aproximadamente a las 24 horas de esta observación se hace una segunda observación (72 horas), que se registra igualmente.
Se recomienda la lectura ciega de los animales tratados y testigos.
- En caso necesario para aclarar los resultados obtenidos con la primera provocación, debe considerarse la posibilidad de realizar, una semana después de esa primera provocación, una segunda (es decir, una «reprovocación»), cuando convenga con un nuevo lote testigo. La reprovocación también puede aplicarse al lote testigo original.
- Deben observarse y registrarse, de acuerdo con la escala de Magnusson y Klignan (véase el apéndice) todas las reacciones cutáneas y cualquier observación extraña, incluidas las reacciones sistémicas, derivadas de los procesos de inducción y provocación. Para aclarar reacciones dudosas, pueden aplicarse otros procedimientos como, por ejemplo, examen histopatológico, medición del espesor del pliegue cutáneo, etc.
- 1.5.2. Ensayo de Eubéier**
- 1.5.2.1. Preparación**
Durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, se aclimatan a las condiciones del laboratorio cobayas albinos jóvenes y sanos. Antes del ensayo, los animales se eligen al azar y se asignan a los lotes de tratamiento. La eliminación del pelo se hace por corte, atizado, o incluso depilación química, en función del método de ensayo utilizado. Debe evitarse la producción, de escoriaciones en la piel. Los animales se pesan antes del ensayo y al final del mismo.
- 1.5.2.2. Condiciones del ensayo**
- 1.5.2.2.1. Animales de laboratorio**
Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albino.

1.5.2.3. Observación y clasificación

- Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se elimina el pelo de la superficie de provocación.
- Una 3 horas después (hacia las 30 horas de la aplicación del parche de provocación) se observan las reacciones cutáneas y se registran de acuerdo con la clasificación recogida en el apéndice.
- Aproximadamente a las 24 horas después de la observación de las 30 horas (hacia las 54 horas de la aplicación del parche de provocación) se vuelven a observar y registrar las reacciones cutáneas.

Se recomienda la lectura ciega de los animales tratados y testigos.

En caso necesario para aclarar los resultados obtenidos en la primera provocación, puede considerarse la realización de una segunda provocación (es decir, una «reprovocación»), en su caso con un nuevo lote testigo, a la semana de haber realizado la primera. También puede realizarse una reprovocación con el lote testigo original.

Deben observarse y registrarse con arreglo a la escala de Magnusson y Kligman (véase el apéndice) todas las reacciones cutáneas y cualquier observación extraña, incluidas las reacciones sistémicas, derivadas de los procesos de inducción y provocación. Pueden llevarse a cabo otros procedimientos como, por ejemplo, el examen histopatológico o la medida del espesor de los pliegues cutáneos, a fin de aclarar reacciones dudosas.

2. RESULTADOS (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)

Los resultados deben resumirse en un cuadro que indique las reacciones cutáneas de cada animal en cada observación.

3. INFORME (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)

Si se realiza un ensayo de cribado, por ejemplo, ensayo de ganglios linfáticos locales (LLNA) o prueba de tumefacción de la oreja del ratón (MEST) antes del ensayo con cobayas, deberá darse una descripción o referencia del ensayo, con datos sobre el método, además de los resultados obtenidos con las sustancias estudiadas y de referencia.

Informe del ensayo (GPMT y ensayo de Buehler)

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

Animales de ensayo:

- cepa de cobaya utilizada
- número, edad y sexo de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- pesos de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- técnicas de preparación del lugar para el parche
- datos de los materiales y técnica de vendaje
- resultado del estudio piloto con sus conclusiones sobre las concentraciones de inducción y provocación que se deban utilizar en el ensayo
- datos de la preparación, aplicación y eliminación de la sustancia estudiada
- justificación de la elección del vehículo
- concentraciones del vehículo y de la sustancia estudiada utilizadas para las exposiciones de inducción y provocación, y cantidad total de sustancia aplicada para la inducción y la provocación.

Resultados:

- resumen de los resultados de la última comprobación realizada de la sensibilidad y habilidad (véase el punto 1.3), incluida la información sobre la sustancia, la concentración y el vehículo que se hayan utilizado
- datos de cada animal, incluido el sistema de clasificación
- descripción de la naturaleza y grado de los efectos observados
- las eventuales observaciones histopatológicas.

Descripción de los resultados:

Conclusiones:

BIBLIOGRAFÍA

El presente método es análogo a la TG 406 de la OCDE.

Apéndice

CUADRO:

Escala de clasificación de Magnusson y Kligman para evaluar las reacciones del ensayo con parche de provocación

- 0 = sin cambios visibles
- 1 = eritema ligero o en manchas localizadas
- 2 = eritema moderado y confluyente
- 3 = eritema intenso y tumefacción

Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales utilizados debe ser mínima y no superar el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

Cuando se realice un estudio de la toxicidad oral con administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, es preferible que se utilicen en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

Número y sexo

Deben utilizarse por los menos 10 animales (cinco hembras y cinco machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio.

Además, puede tratarse un grupo satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con la dosis más elevada durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (cinco de cada sexo).

Dosis

Deben utilizarse generalmente como mínimo tres lotes de ensayo y un lote testigo. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia de ensayo, el lote testigo recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

Si, a partir de la evaluación de otros datos, no cabe esperar ningún efecto con la dosis de 1 000 mg/kg peso corporal/día, puede realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio de búsqueda de dosis.

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos o toxicocinéticos disponibles en relación con la sustancia de ensayo o productos aines. La dosis elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento intenso. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis a fin de poner de manifiesto las posibles respuestas en función de la dosis; y la dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuadruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 10) entre dosis.

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante garantizar que las cantidades de la sustancia de ensayo utilizadas no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales; deberá indicarse que alternativa se ha seguido. En el caso de una sustancia administrada por sonda, la dosis debe darse todos los días a una hora similar, y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal.

Cuando se utilice un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar.

Ensayo límite

Si un ensayo con una sola dosis (de, al menos, 1000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración con los alimentos o el agua de bebida, con una concentración equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal), siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente aines, no debería esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es aplicable salvo cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

Periodo de observación

El periodo de observación debe ser de 28 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite previsto para las observaciones de seguimiento durante al menos otros 14 días sin tratamiento, a fin de detectar la aparición retardada o la persistencia o la recuperación de los efectos tóxicos.

Texto que sustituye al Capítulo B.7, del Anexo V, del Reglamento.

B.7. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) POR VÍA ORAL.

1. MÉTODO

1.1 Introducción

Véase la introducción general de la Parte B.

1.2 Definiciones

Véase la introducción general de la Parte B.

1.3 Principio del método

La sustancia de ensayo se administra diariamente por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante un periodo de 28 días. A lo largo del periodo de administración, se observa a los animales todos los días acamante con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

El presente método insiste más en los efectos neurológicos, como parámetro específico, y en la necesidad de hacer observaciones clínicas atentas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método sirve para detectar productos químicos con potencial neurotóxico, lo que puede justificar la realización de investigaciones más profundas de este aspecto. Además, el método puede proporcionar una indicación de los efectos inmunológicos y de la toxicidad sobre los órganos reproductores.

1.4 Descripción del método

1.4.1 Preparación

Se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en los lotes testigo y tratado. Las isaias deben disponerse de forma que se rouzcan al mínimo los posibles efectos debidos al embauiamiento. Los animales se identifican individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos cinco días antes del inicio del ensayo, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

La sustancia de ensayo se administra por sonda o con el alimento o el agua de bebida. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, se considere en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una emulsión o solución oleosa (por ejemplo, aceite de maiz) y, a continuación, la posible disolución en otros vehículos. En caso de vehículos distintos del agua, deberán conocerse sus características toxicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en el vehículo.

1.4.2 Condiciones del ensayo

1.4.2.1 Animales de laboratorio

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Hay que utilizar animales jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nuparas y no gravidas. La administración debe empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad.

1.4.3.

Procedimiento

Las dosis de sustancia se administran a los animales todos y cada uno de los días del período de 28; es necesario justificar el uso eventual de una posología de sólo cinco días por semana. Cuando la sustancia estudiada se administre por alimentación forzada, deberá hacerse con una sola dosis utilizando una sonda gástrica o una cánula adecuada de intubación. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen no debe pasar de 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que mostrarían normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo deben reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis.

Observaciones generales

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado sanitario de los animales. Al menos dos veces el día se observará la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Cuando se vean, se sacarán los animales debidos y los que padezcan dolor o sufrimiento grave, se sacrificarán de forma compasiva y se someterán a necropsia.

Se someterán todos los animales a observación clínica detallada antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y al menos una vez por semana después. Estas observaciones deben hacerse fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y de preferencia, siempre a la misma hora. Estas observaciones deben registrarse cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos explícitamente por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos anómalos deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, respiración anormal). Deben registrarse también los cambios observados en la marcha, postura y respuesta, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipos (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anormales (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás).

En la cuarta semana de exposición deben evaluarse la receptividad sensorial frente a estímulos de distintos tipos (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos), la fuerza de prensión y la actividad motriz. En la bibliografía véase la introducción general de la Parte B) se encuentran más datos sobre los procedimientos que pueden seguirse.

Las observaciones funcionales de la cuarta semana de exposición pueden omiarse cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica (de 90 días). En ese caso, las observaciones funcionales deberán incluirse en este estudio de continuación. Por otra parte, la disponibilidad de datos sobre las observaciones funcionales en el estudio de administración continuada puede facilitar la selección de las dosis utilizadas en un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica.

De forma excepcional, las observaciones funcionales pueden omiarse también en lotes que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfirieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.

1.4.3.2. Peso corporal y consumo de alimento y agua

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales y debe medirse el consumo de alimentos y agua. Si la sustancia estudiada se administra con el agua de bebida, deberá medirse también el consumo de agua al menos semanalmente.

1.4.3.3.

Hematología

Los exámenes hematológicos siguientes deben practicarse al final del período de ensayo: hematócrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación de la sangre.

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes del sacrificio de los animales (o como parte del método de sacrificio), y conservarse en condiciones adecuadas.

1.4.3.4. Bioquímica clínica

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes sobre los tejidos y, especialmente, en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de su sacrificio o como parte del método de sacrificio (aparte de los monbudos o sacrificados a lo largo del ensayo). Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior antes de la toma de muestra⁽¹⁾. Los parámetros medidos del plasma o del suero incluirán las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albuminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa, o sorbitol deshidrogenasa). La medida de otras enzimas (de origen hepático o no) y de acidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

De forma opcional, pueden realizarse las siguientes determinaciones de orina en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolaridad o densidad, pH, proteínas, glucosa y sangre o células sanguíneas.

Además, debe considerarse la realización de estudios para investigar marcadores sencillos de lesiones tisulares generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia estudiada pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, fósforo, triglicéridos en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Se estudiará la necesidad de hacer estas determinaciones con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

En general, es necesario aplicar un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

Si, los datos de que se dispone sobre antecedentes no son adecuados, debe considerarse la determinación de variables hematológicas y bioquímicas antes de iniciar la administración de la sustancia.

1.4.3.5. Necropsia macroscópica

Se debe practicar una necropsia macroscópica completa y detallada a todos los animales utilizados en el estudio, incluyendo aspectos como un examen atento de la superficie corporal externa, todos los orificios, y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, capsulas suprarrenales, testículos, epididimos, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales se limpiarán de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará su peso húmedo - antes posible tras la disección, a fin de evitar su desecación.

Los tejidos que figuran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico posterior a que se vaya a someter: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia anular), médula espinal, estómago, intestino delgado y grueso (incluyendo las placas de Peyer), hígado, riñones, capsulas suprarrenales, bazo, corazón, timo, tirónes, tráquea y pulmones (conservados mediante inyección con fijador, seguido de inmersión), gonadas, órganos sexuales secundarios (por ejemplo, útero, próstata), vejiga urinaria, ganglios linfáticos (preferiblemente un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma, para tener en cuenta los efectos sistémicos, nervios periféricos (sciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, y una sección de la médula ósea (o bien puede optarse por médula ósea aspirada y recién montada). Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia estudiada.

(1) El ayuno desde la víspera es preferible para ciertas medidas del suero y del plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal de esta preferencia es que el aumento de la variabilidad que provocara necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y hacer más difícil la interpretación. Por otra parte, no obstante, el ayuno desde la víspera puede interferir con el metabolismo general de los animales y, especialmente en estudios de alimentación, puede alterar la exposición diaria a la sustancia estudiada. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse determinaciones bioquímicas clínicas después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio.

1.4.3.6. Examen histopatológico

Hay que practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis elevada y del lote testigo. Estos exámenes deben ampliarse a animales de todos los demás lotes tratados, en caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote de dosis elevada.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Cuando se utilice un lote satélite, deberá hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados.

2. RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que muestre, respecto a cada lote, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales encontrados muertos durante la prueba o sacrificados por razones compasivas (y el momento de la muerte o sacrificio), el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de estos signos de toxicidad observados (con inclusión del momento de aparición, duración y gravedad de los efectos tóxicos), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales en los que se haya observado cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y de amplia aceptación. Los métodos estadísticos deberán seleccionarse en la fase de diseño del estudio.

3.

INFORME

Informe del ensayo

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

Animales de ensayo:

- especie y variedad utilizada
- número, edad y sexo de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- peso de cada animal al inicio del ensayo, a intervalos semanales después, y al final del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua
- justificación de la selección de las dosis
- datos sobre la formulación de la sustancia estudiada o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado
- datos de la administración de la sustancia estudiada
- conversión de la concentración (ppm) de la sustancia estudiada en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), en su caso
- datos de la calidad de los alimentos y del agua

Resultados:

- peso corporal y cambios de peso corporal
- consumo de alimentos y de agua, en su caso
- datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas, (sean reversibles o no)
- evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motora
- pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia
- pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia
- peso corporal en el momento del sacrificio y datos sobre el peso de los órganos
- observaciones de la necropsia
- descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas
- datos sobre la absorción, si los hay
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

Este método es análogo a la TG 407 de la OCDE.

ANEXO B
PARTE V

Nuevo texto a incorporar en el Anexo V del Reglamento.

B.37. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS
POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA

MÉTODO

Introducción

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de embudo *in vitro* para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios *in vitro* no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Véase la introducción general de la Parte B.

1.2. Definiciones

Sustancias organofosforadas: ésteres organofosforados sin carga, ésteres o anhídridos de ácidos organofosfónicos, organofosfónicos u organofosforamídicos, o de ácidos fosforónicos, fosfónicos o fosforamídicos alíneos, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase de sustancias.

Neurotoxicidad retardada: síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, atonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterase diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. Sustancias de referencia

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia con un lote de control positivo como medio para demostrar que, en las condiciones de ensayo del laboratorio, no cambia significativamente la respuesta de las especies utilizadas.

Como ejemplo de neurotóxico de amplia utilización está el folfato de tri-n-butilo [*n*. CAS 78-30-8, *n*. EINECS 201-103-5, denominación: CAS; *un*(2-metilfenil) éster del ácido fosfónico], conocido también como tri-*n*-butilfosfato.

1.4. Principio del método

Se da una sola dosis oral de la sustancia estudiada a gallinas domésticas, protegidas de los efectos colinérgicos agudos, cuando convenga. Se observa durante 21 días la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterase diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la administración. A los 21 días de la exposición, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

1.5. Descripción del método

1.5.1. Preparación

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de trata-

miento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará normalmente por vía oral, utilizando sondas gástricas, cápsulas de gelatina o un método similar. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.5.2. Condiciones del ensayo

1.5.2.1. Animales de experimentación

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta (*Gallus gallus domesticus*), de una edad comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.5.2.2. Número y sexo

Además del lote de tratamiento, se utilizarán tanto un lote de control del vehículo como un lote de control positivo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (tres en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras seis puedan sobrevivir durante el período de 21 días de observación de las patologías.

El lote de control positivo puede estudiarse a la vez o bien ser un lote de control estudiado recientemente. Debe incluir al menos seis gallinas, tratadas con un neurotóxico conocido de efecto retardado, de las que tres se destinarán a las pruebas bioquímicas y otras tres a la observación de la patología. Se recomienda la actualización periódica de los datos de los antecedentes. Deben obtenerse nuevos datos de lotes de control positivo cuando el laboratorio que realice las pruebas haya cambiado algún elemento fundamental de estas (por ejemplo, raza, alimentación, condiciones de alojamiento).

1.5.2.3. Dosis

Debe realizarse un estudio preliminar con un número adecuado de gallinas y lotes de distintas dosis, a fin de determinar la dosis que debe utilizarse en el estudio principal. En el estudio preliminar es necesario que se produzca retardado, a fin de definir una dosis adecuada para el estudio principal. No obstante, para evitar la muerte debida a los efectos colinérgicos agudos, puede utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas. Pueden utilizarse diversos métodos de ensayo para evaluar la dosis máxima no letal de las sustancias estudiadas (véase el método B.1.6). También puede ayudar a seleccionar la dosis la consideración de datos de antecedentes de las gallinas u otra información toxicológica.

La dosis de la sustancia en el estudio principal debe ser la más elevada posible, teniendo en cuenta los resultados del estudio preliminar de selección de la dosis y el límite superior a 2 000 mg/kg de peso corporal. La mortalidad que pueda darse no debe interferir con la supervivencia de animales suficientes para las pruebas bioquímicas (scis) e histológicas (scis) hasta el día 21. Debe utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas, para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos.

1.5.2.4. Ensayo límite

Si un ensayo con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

- 1.5.2.5. **Periodo de observación**
El periodo de observación debe ser de 21 días.
- 1.5.3. **Procedimiento**
Tras administrar un protector para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos, se administra una sola dosis de la sustancia estudiada.
- 1.5.3.1. **Observación general**
La observación debe iniciarse inmediatamente tras la administración. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente varias veces durante los 2 primeros días y posteriormente al menos una vez al día durante un periodo de 21 días o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración de las anomalías de comportamiento. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas seleccionadas para la observación de las patologías y someterse a un periodo de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacrificarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.
- 1.5.3.2. **Peso corporal**
Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.
- 1.5.3.3. **Bioquímica**
En el plazo de unos días después de la administración, deben sacrificarse seis gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo, y tres del lote de control positivo (cuando este lote se utilice en paralelo). El cerebro y la médula lumbar se preparan y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterase diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterase diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificarán tres aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras tres a las 48 horas, mientras que las tres gallinas de los controles positivos se sacrificarán a las 24 horas. Si la observación de signos clínicos de intoxicación (esta puede evaluarse frecuentemente observando el momento de aparición de signos colinérgicos) indica que el agente tóxico se elimina muy despacio, podrá ser preferible tomar dos veces lotes de tres aves entre las 24 y las 72 horas a partir de la administración. También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse in situ una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.
- 1.5.3.4. **Autopsia macroscópica**
La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.
- 1.5.3.5. **Examen histopatológico**
Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del periodo de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán *in situ*, utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebro (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones medio-dorsal y lumbosacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón.
2. **RESULTADOS**
La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros si puede hacer necesaria otra evaluación.
Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.
Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.
Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.
3. **INFORME**
Informe del ensayo
El informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:
Animales de ensayo:
— variedad utilizada
— número y edad de los animales
— origen, condiciones de alojamiento, etc.
— peso de cada animal al inicio de la prueba.
Condiciones del ensayo:
— datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga
— justificación de la elección del vehículo
— datos sobre la administración de la sustancia estudiada
— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua
— justificación de la selección de la dosis
— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado
— identidad y datos de la administración de cualquier protector.
Resultados:
— datos sobre el peso corporal
— datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad
— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no)
— descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas
— observaciones de la autopsia
— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas
— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.
Duración de los resultados.
Conclusiones.
4. **REFERENCIAS**
El presente método es análogo a la TG 418 de la OCDE.

B38. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS. ESTUDIO POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE 28 DÍAS

1. MÉTODO

1.1.

Introducción

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado *in vitro* para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios *in vitro* no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Este ensayo de 28 días de neurotoxicidad retardada proporciona información sobre los riesgos sanitarios que puede provocar una exposición repetida a lo largo de un periodo limitado de tiempo. Da información sobre la respuesta a las dosis y proporciona una estimación del nivel sin efectos adversos observados que puede ser útil para establecer intentos de seguridad de la exposición.

Vease la introducción general de la Parte B

1.2. Definiciones

Sustancias organofosforadas: ésteres ureanofosforados sin carga, ésteres o anhidridos de ácidos organofosforicos, organofosforicos u organofosforamidos, y ée ácidos fosforotóxicos, fosfonicos o fosforonamidicos libres, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada con o veces se aprecia en esta clase de sustancias

Neurotoxicidad retardada: síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, atropías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envenenamiento de la esterasa oiana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. Principio del método

Se dan dosis orales diarias de la sustancia estudiada a gallinas domésticas durante 28 días. Se observa al menos diariamente la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis, hasta que pasen 14 días desde la última administración. Se realizan medicas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa oiana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la última administración. A las dos semanas de la última dosis, se sacrifican las gallinas restantes y se procede a examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados

1.4. Descripción del método

1.4.1. Preparación

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir con tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará todos y cada uno de los días por vía oral, de preferencia utilizando sondas gástricas o capsulas de gelatina. Los líquidos pueden administrarse sin diluir en disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en capsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.4.2. Condiciones del ensayo

1.4.2.1. Animales de experimentación

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta (*Gallus gallus domesticus*), de una edad comprendida entre 6 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.4.2.2. Número y sexo

Se utilizarán generalmente al menos tres lotes de tratamiento y un lote de control del vehículo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas libres en cada uno de los dos momentos seleccionados y otras seis puedan sobrevivir durante el periodo de 14 días tras la exposición destinada a la observación.

Dosis

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los resultados de un ensayo de neurotoxicidad aguda retardada y cualesquiera otros datos existentes sobre toxicidad o cinética del compuesto estudiado. La dosis superior debe elegirse con el fin de inducir efectos tóxicos, de preferencia neurotoxicidad retardada, pero sin producir la muerte ni sufrimiento patente. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior.

1.4.2.4. Ensayo límite

Si un ensayo con una dosis de al menos 1000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para le presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable cuando la exposición humana prevista indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.4.2.5. Periodo de observación

Todos los animales se observarán al menos una vez al día durante el periodo de exposición y durante 14 días después, salvo en los casos de autopsia prevista.

1.4.3. Procedimiento

Los animales reciben la sustancia estudiada todos y cada uno de los días durante un periodo de 28 días.

1.4.3.1. Observación general

La observación debe iniciarse inmediatamente tras el inicio del tratamiento. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día durante cada uno de los 28 días del tratamiento y durante 14 días tras la última administración o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración. Las observaciones incluirán las anomalías del comportamiento, sin imbuirse a ellas. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas y someterse a un periodo de actividad motriz forzada (como subir de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

1.4.3.2. Peso corporal

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la primera administración de la sustancia estudiada y a intervalos de una vez por semana posteriormente.

1.4.3.3. Bioquímica

En el plazo de unos días después de la última administración, deben sacrificarse seis gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo. El cerebro y la médula lumbar se prepararan y estudiaran para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificaran tres aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras tres a las 48 horas de la última administración. Si de datos procedentes del estudio de toxicidad aguda o de otros estudios (por ejemplo, de toxicocinética), se deduce que es preferible utilizar otros tiempos de sacrificio tras la última administración, entonces deberán aplicarse estos tiempos aportando la justificación pertinente.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse *in vivo* una recuperación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

1.4.3.4. Autopsia macroscópica

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.4.3.5. Examen histopatológico

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán *in situ*, utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones media-dorsal y lombo-sacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón. En principio, debe hacerse el examen microscópico de los tejidos conservados de todos los animales de los lotes de control y de dosis alta. Cuando haya pruebas de efectos en el lote de dosis alta, deberá hacerse también el examen microscópico de las gallinas de los lotes de dosis intermedia y baja.

2. RESULTADOS

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros si puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

INFORME

Informe del ensayo

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

Animales de ensayo:

- variedad utilizada
- número y edad de los animales
- origen, condiciones de alojamiento, etc.
- peso de cada animal al inicio de la prueba.

Condiciones del ensayo:

- datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga
- justificación de la elección del vehículo
- datos sobre la administración de la sustancia estudiada
- datos sobre la calidad de los alimentos y del agua
- justificación de la selección de la dosis
- especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado
- justificación de la elección de los tiempos para las determinaciones bioquímicas, en caso de que no sean 24 y 48 horas.

Resultados:

- datos sobre el peso corporal
- datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad
- nivel sin efectos adversos observados
- naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no)
- descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas
- observaciones de la autopsia
- descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

*Discusión de los resultados**Conclusiones*

REFERENCIAS

El presente método es análogo a la TG 419 de la OCDE.

C. El texto del punto 3.2.6.3 se sustituye por el texto siguiente:

3.2.6.3. Irritación del aparato respiratorio

Se asignará la siguiente frase de riesgo según los criterios indicados:

R 37 Irrita las vías respiratorias

Sustancias y preparados que pueden producir una irritación grave del aparato respiratorio, basándose principalmente en:

- la observación práctica de personas
- los resultados positivos de ensayos adecuados con animales

Comentarios sobre el uso de R 37

Al interpretar las observaciones prácticas en personas, habrá que tener cuidado en distinguir los efectos que conducen a la clasificación con R 48 (véase el punto 3.2.4) de aquellos que llevan a la clasificación con R 37. Las situaciones que normalmente llevan a la clasificación con R 37 son reversibles y suelen estar limitadas a las vías respiratorias superiores.

Entre los resultados positivos de ensayos adecuados con animales se cuentan los datos de los ensayos generales de toxicidad, incluidos los datos histopatológicos del aparato respiratorio. Para juzgar la irritación de las vías respiratorias, se podrán utilizar también los datos de la medición de la bradipnea experimental.

D. El texto del punto 3.2.7 Sensibilización se sustituye por el siguiente texto:

3.2.7. Sustancias y preparados sensibilizantes

3.2.7.1. Sensibilización por inhalación

Las sustancias y preparados se clasificarán como sensibilizantes y recibirán el símbolo "Xn", la indicación de peligro "Noxi" y la frase de riesgo R 42 según los criterios indicados a continuación:

R 42 Posibilidad de sensibilización por inhalación

— Si hay pruebas de que dichas sustancias o preparados pueden provocar hipersensibilidad respiratoria específica

— Si hay resultados positivos de ensayos adecuados con animales

— Si la sustancia es un isocianato, a no ser que haya pruebas de que la sustancia no causa hipersensibilidad respiratoria específica

Comentarios sobre el uso de R 42

Pruebas en las personas

Las pruebas de que una sustancia puede causar hipersensibilidad respiratoria específica deberán estar basadas normalmente en experiencias con personas. En este caso, la hipersensibilidad se traduce normalmente por asma, pero se considerarán también otras reacciones de hipersensibilidad como la trinitis y la alveolitis. La alteración tendrá el carácter clínico de una reacción alérgica. No obstante, no tendrán que demostrarse los mecanismos inmunológicos.

Al considerar las pruebas de exposición en las personas, para tomar una decisión sobre la clasificación será necesario, además de las pruebas de los casos, tener en cuenta:

- el tamaño de la población expuesta
- la importancia de la exposición.

ANEXO C

Modificaciones que se introducen en el Anexo VI del Reglamento.

A. Los puntos 8 y 9 del Índice del Anexo quedan modificados de la siguiente manera:

8. CASOS ESPECIALES: SUSTANCIAS

8.1. Bombonas portátiles de gas

8.2. Bombonas de gas propano, butano o gas licuado de petróleo (GLP)

8.3. Metales en forma maciza

8.4. Sustancias clasificadas con R 65

9. CASOS ESPECIALES: PREPARADOS

9.1. Preparados gaseosos (mezclas de gases)

9.2. Bombonas de gas para preparados que contengan propano, butano o gas licuado de petróleo (GLP) (étido)

9.3. Aleaciones, preparados que contengan polímeros, preparados que contengan elastómeros

9.4. Preparados clasificados con R 65

9.5. Peróxidos orgánicos

B. En el punto 2.3.3 después de los criterios de R 20 «Noxi» por inhalación, se añade el siguiente texto:

-R 65 Noxi: Si se igniere puede causar daño pulmonar.

Sustancias y preparados líquidos que presenten riesgo de aspiración para las personas debido a su baja viscosidad:

a) En el caso de sustancias y preparados que contengan hidrocarburos alifáticos, alifáticos o aromáticos en una concentración total, igual o superior al 10 % y que tengan:

- un periodo de flujo inferior a 10 s en un recipiente ISO de 3 mm con arreglo a EN 535, o
- una viscosidad cinemática medida con un viscosímetro capilar de cristal calibrado con arreglo a ISO 3104/3105 inferior a $7 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$ a 40°C , o
- una viscosidad cinemática derivada de las mediciones de la viscosimetría rotativa con arreglo a ISO 3219 inferior a $7 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$ a 40°C .

Notese que las sustancias y preparados que cumplen estos criterios no tienen por qué ser clasificados si su tensión superficial media es superior a $2,5 \text{ mN/m}$ a 40°C .

b) En el caso de las demás sustancias y preparados, no sujetos a los criterios anteriores, según la experiencia práctica con personas.

Las pruebas a las que se hace referencia anteriormente pueden ser:

- el historial clínico y los datos de los ensayos adecuados de función pulmonar relacionados con la exposición a la sustancia, confirmados por otras pruebas de apoyo que pudieran incluir:
 - una estructura química similar a la de sustancias de las que se sabe causan hipersensibilidad respiratoria
 - un ensayo inmunológico *in vivo* (p. ej.: ensayo de pinchazo en la piel)
 - un ensayo inmunológico *in vitro* (p. ej.: análisis serológico)
- estudios que indiquen otros mecanismos específicos de acción no inmunológicos, p. ej.: irritación repetida de baja intensidad, efectos de mediación farmacológica.
- datos de ensayos positivos de estimulación bronquial con la sustancia realizados de acuerdo con directrices aprobadas para la determinación de: una reacción de hipersensibilidad específica.

El historial clínico deberá incluir tanto la historia médica como la laboral para determinar la relación entre la exposición a una sustancia específica y el desarrollo de la hipersensibilidad específica. Entre la información pertinente se incluirán factores agravantes tanto en casa como en el lugar de trabajo, la aparición y la evolución de la enfermedad, los antecedentes familiares y el historial médico del paciente en cuestión. El historial médico incluirá también información sobre toda enfermedad alérgica o respiratoria desde la infancia y si el paciente es fumador o no.

Los resultados de los ensayos de estimulación bronquial positivos serán considerados por sí mismos prueba suficiente para la clasificación. Sin embargo, se sabe que en realidad ya se habrán realizado muchos de los exámenes anteriormente enumerados.

Las sustancias que causan síntomas de asma por irritación únicamente en personas con hipersensibilidad bronquial no recibirán la frase R 42.

Estudios en animales

Los datos de los ensayos que son indicadores del potencial de una sustancia para causar sensibilización por inhalación en las personas incluyen:

- mediciones de IgE (p. ej.: en ratones)
- respuesta pulmonar específica de los conejillos de Indias.

3.2.7.2. Sensibilización por contacto cutáneo

Las sustancias y preparados se clasificarán como sensibilizantes y recibirán el símbolo "Xi", la indicación de peligro "Irritante" y la frase de riesgo R 43 según los criterios indicados a continuación:

R 43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel

- si la experiencia práctica demuestra que la sustancia o preparado es capaz de inducir sensibilización por contacto con la piel en un número significativo de personas
- si hay resultados positivos en ensayos adecuados con animales.

Comentarios acerca del uso de R 43

Pruebas con personas

Las siguientes pruebas (experiencias prácticas) son suficientes para clasificar una sustancia con R 43:

- datos positivos de ensayos apropiados con parches, normalmente en más de una clínica dermatológica, o

- estudios epidemiológicos que muestren dermatitis alérgicas de contacto causadas por la sustancia. Las situaciones en las que una gran parte de los expuestos presentan los síntomas característicos deben considerarse con especial cuidado, incluso si el número de casos es pequeño, o
- datos positivos de estudios experimentales con personas (véase el punto 3.1.1).

Para clasificar un sustancia con R 43 será suficiente, si hay pruebas que apoyen lo siguiente:

- episodios aislados de dermatitis alérgica de contacto, o
 - estudios epidemiológicos en los que no se hayan descartado totalmente con confianza razonable las casualidades, los sesgos o los factores de confusión.
- Entre las pruebas de apoyo se podrán incluir:
- datos de ensayos con animales efectuados de acuerdo con directrices existentes, con un resultado que no cumpla los criterios expuestos en la sección dedicada a estudios con animales, pero estén suficientemente cerca del límite como para considerarlos significativos, o
 - datos de métodos no normalizados, o
 - relaciones adecuadas entre estructura y actividad.

Estudios con animales

Se considerarán resultados positivos en los ensayos con animales:

En el caso del método de ensayo con adyuvante de sensibilización de la piel descrito en el Anexo V o en caso de otros métodos de ensayo con adyuvante, se considerará positiva una respuesta en al menos el 30 % de los animales. En cualquier otro método de ensayo se considerará positiva una respuesta de al menos el 15 %.

3.2.7.3. Urticaria inmunológica de contacto

Algunas sustancias que cumplen los criterios de R 42 pueden causar, además, urticaria inmunológica de contacto. En esos casos, se incluirá en la ficha de datos de seguridad la información sobre la misma mediante las frases S adecuadas, normalmente las S 24 y S 36/37.

En el caso de las sustancias que provocan signos de urticaria inmunológica de contacto que no cumplen los criterios de R 42, se considerará el clasificarlas con R 43.

No hay modelo animal reconocido disponible para determinar las sustancias que causan urticarias inmunológicas de contacto. Por lo tanto, la clasificación se basará normalmente en pruebas con personas que serán similares a las de sensibilización de la piel (R 43).

3.2.7.4. Note-se que, si se asignan el símbolo "Xn" y la indicación de riesgo "nocivo" serán optativos el símbolo "Xi" y la indicación de riesgo "irritante".

E. El texto de los criterios de S 62 del punto 6 se sustituye por el siguiente:

*S 62 En caso de ingestión, no provocar el vómito; acudir inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

— Aplicación:

- sustancias y preparados clasificados como nocivos con R 65 según los criterios del punto 3.2.3

Sin embargo, no obstante lo dispuesto en los apartados 1 y 2 del artículo 8, en el caso de las bombonas de gas con una capacidad de agua inferior o equivalente a 150 litros, el formato y las dimensiones de la etiqueta podrán seguir las prescripciones de la norma ISO 7225. En este caso, la etiqueta podrá llevar la denominación genérica o el nombre comercial o industrial del preparado, siempre que las sustancias peligrosas que compongan el preparado figuren en el cuerpo de la bombona de gas de forma clara e indelible.

La información especificada en el artículo 7 podrá incluirse en un disco o etiqueta informativos duraderos sujetos a la bombona."

J. En el punto 9 se introducirá el siguiente punto:

9.2. Bombonas de gas para preparados que contengan propano, butano o gas licuado de petróleo (GLP) fétido

El propano, el butano y el gas licuado de petróleo están clasificados en el Anexo I. Aunque los preparados que contienen esas sustancias están clasificados con arreglo al artículo 3 del Reglamento de Preparados Peligrosos (Real Decreto 1078/93), no representan un riesgo para la salud humana cuando son comercializados en bombonas rellenables cerradas o en cartuchos no rellenables pertenecientes al campo de aplicación de EN 417 como gases combustibles que sólo son liberados para la combustión.

Esas bombonas y cartuchos deberán llevar la etiqueta con el símbolo apropiado y las frases R y S sobre la inflamabilidad. No se exige en la etiqueta información sobre los efectos en la salud humana. Sin embargo, la información sobre los efectos en la salud humana que debería figurar en la etiqueta la enviará al usuario profesional la persona responsable de la comercialización de esa sustancia con arreglo al modelo previsto en el artículo 10 del Reglamento de Preparados Peligrosos (Real Decreto 1078/93). Se transmitirá suficiente información al consumidor para que pueda tomar todas las medidas necesarias de protección de la salud y de la seguridad, según se dispone en el artículo 10.1.c del Reglamento de Preparados Peligrosos (Real Decreto 1078/93).

G. El título del punto «8.2. Metales en forma maciza» se sustituye por:

«8.3. Metales en forma maciza»

H. En el punto 8 se introduce el siguiente punto:

«8.4. Sustancias clasificadas con R 65

Las sustancias clasificadas como nocivas por el riesgo de aspiración no tendrán que ser etiquetadas como nocivas con R 65 cuando sean comercializadas en envases para aerosoles o en envases con un dispositivo nebulizador sellado».

I. El texto del punto 9.1.3 se sustituye por el siguiente:

«9.1.3. Etiquetado

En el caso de las bombonas de gas se considerará que se han cumplido los requisitos sobre el etiquetado cuando estén conformes con la letra b) del apartado 4 del artículo 8 del Reglamento de Preparados Peligrosos (Real Decreto 1078/93).

— no aplicable a sustancias y preparados que se comercializan en envases para aerosoles (o en envases equipados de un dispositivo nebulizador sellado), veanse los puntos 8 y 9.

— Criterios de utilización:

— obligatoria para las sustancias y preparados antes citados, si se venden al público en general o es probable su uso por este

— recomendada para las sustancias y preparados antes citados cuando se empleen en la industria».

F. En el punto 8 se introduce el siguiente punto:

«8.2. Bombonas de gas propano, butano o gas licuado de petróleo (GLP)

Estas sustancias están clasificadas en el Anexo I. A pesar de estar de conformidad con el artículo 2, no suponen un riesgo para la salud humana si son comercializadas en bombonas rellenables cerradas o en cartuchos no rellenables que pertenecen al campo de aplicación de EN 417 como gases combustibles que sólo se liberan para la combustión.

Esas bombonas o cartuchos deben estar etiquetados con el símbolo apropiado y las frases R y S acerca de la inflamabilidad. No se exige en la etiqueta información sobre los efectos en la salud humana. Sin embargo, la información sobre los efectos en la salud humana que debería figurar en la etiqueta la enviará al usuario profesional la persona responsable de la comercialización de esa sustancia con arreglo al modelo previsto en el artículo 23 del Reglamento de sustancias peligrosas (Real Decreto 363/95). Se transmitirá suficiente información al consumidor para que pueda tomar todas las medidas necesarias de protección de la salud y de la seguridad, según se dispone en el artículo 10 y el Anexo III del Reglamento de preparados peligrosos (Real Decreto 1078/93) y en el artículo 23 y el Anexo XI del Reglamento de sustancias peligrosas (Real Decreto 363/95).

K. El título del punto «9.2. Aleaciones, preparados que que contengan polímeros y preparados que contengan elastómeros» se sustituye por:

«9.3. Aleaciones, preparados que contengan polímeros y preparados que contengan elastómeros».

L. En el punto 9 se añade el siguiente punto:

«9.4. Preparados clasificados con R 65

Los preparados clasificados como nocivos por el riesgo de aspiración no tendrán que ser etiquetados como nocivos con R 65 cuando sean comercializados en envases para aerosoles o en envases con un dispositivo nebulizador sellado».

M. El título del punto «9.4. Peroxidos orgánicos» se sustituye por:

«9.5. Peroxidos orgánicos».