



BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO

AÑO CCCXLVI • VIERNES 28 DE ABRIL DE 2006 • SUPLEMENTO DEL NÚMERO 101

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

7581

ORDEN PRE/1244/2006, de 20 de abril, por la que se modifican los anexos I y V del Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.

ANEXOS



MINISTERIO
DE LA PRESIDENCIA

ANEXO IA

Nota K:

No es necesario aplicar la clasificación como carcinógeno o mutágeno, si puede demostrarse que la sustancia contiene menos del 0,1 % en peso de 1,3-butadieno (número Eines 203-450-8). Si la sustancia no está clasificada como carcinógeno o mutágeno, deberán aplicarse como mínimo las frases S (2-)-9-16. Esta nota sólo se aplica a determinadas sustancias complejas derivadas del carbón y del petróleo incluidas en el anexo I.

ANEXO IB

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|------------|---|--|--|---|
| 006-005-00-4 | tiram disulfuro de tetrametiltiuram disulfuro de bis (N,N-dimetiltiocarbamilo) | | 205-286-2 | 137-26-8 | Xn; R20/22-48/22 Xi; R36/38 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 20/22-36/38-43-48/22-50/53 S: (2-)-26-36/37-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-36/38-43-48/22-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R36/38-43-48/22-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-50-53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 006-006-01-7 | cianuro di hidrógeno ...% ácido cianhídrico ...% | B | 200-821-6 | 74-90-8 | T+; R26/27/28 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)/7/9-16-36/37-38-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-51-53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-51-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23/24/25-52-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22 | |
| 006-012-00-2 | ziram (ISO) bis (N,N-dimetiltiocarbamato) de cinc | | 205-288-3 | 137-30-4 | T+; R26 Xn; R22-48/22 Xi; R37-41 R43 N; R50-53 | T+; N R: 22-26-37-41-43-48/22-50/53 S: (1/2-)/22-26-28-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R22-26-37-41-43-48/22-50-53 20 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26-37-41-43-48/22-50-53 10 % ≤ C < 20 %: T+, N; R26-41-43-48/22-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R26-36-43-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23-36-43-50-53 1 % ≤ C < 5 %: T, N; R23-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 | |
| 006-021-00-1 | linuron (ISO) 3-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1-metoxiurea | E | 206-356-5 | 330-55-2 | Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53 | T; N R: 61-22-40-48/22-62-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 006-044-00-7 | isoproturon 3-(4-isopropilfenil)-1,1-dimetilurea | | 251-835-4 | 34123-59-6 | Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53 | Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)/36/37-60-61 | C ≥ 2,5 %: Xn, N; R40-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R40-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 006-072-00-X | N,N-dipropiltiocarbamato de S-bencilo | | 401-730-6 | 52888-80-9 | Xn; R22 R43 N; R51-53 | Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)/24-37-61 | | |
| 006-089-00-2 | dióxido de cloro | | 233-162-8 | 10049-04-4 | O; R8 R6 T+; R26 C; R34 N; R50 | O; T+; N R: 6-8-26-34-50 S: (1/2-)/23-26-28-36/37/39-38-45-61 | C ≥ 5 %: T+, N; R26-34-50 1 % ≤ C < 5 %: T+, N; R26-36/37/38-50 0,5 % ≤ C < 1 %: T, N; R23-36/37/38-50 0,2 % ≤ C < 0,5 %: T, N; R23-50 0,02 % ≤ C < 0,2 %: Xn; N; R20-50 | |
| 006-089-01-X | dióxido de cloro . . . % | B | 233-162-8 | 10049-04-4 | T; R25 C; R34 N; R50 | T; N R: 25-34-50 S: (1/2-)/23-26-28-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R25-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R22-34-50 3 % ≤ C < 10 %: Xn; N; R22-36/37/38-50 0,3 % ≤ C < 3 %: Xi; R36 | |
| 007-001-00-5 | amoníaco, anhidro | | 231-635-3 | 7664-41-7 | R10 T; R23 C; R34 N; R50 | T; N R: 10-23-34-50 S: (1/2-)/9-16-26-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23-34-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R23-34 0,5 % ≤ C < 5 %: Xn; R20-36/37/38 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-----------|--|---|---|---|
| 007-008-00-3 | hidrazina | E | 206-114-9 | 302-01-2 | R10 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53 | T; N R: 45-10-23/24/25-34-43-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-20/21/22-34-43-51/53 3 % ≤ C < 10 %: T, N; R45-20/21/22-36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R45-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45 | |
| 007-010-00-4 | nitrito de sodio | | 231-555-9 | 7632-00-0 | O; R8 T; R25 N; R50 | O; T; N R: 8-25-50 S: (1/2-)45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R25-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R25 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R22 | |
| 007-011-00-X | nitrito de potasio | | 231-832-4 | 7758-09-0 | O; R8 T; R25 N; R50 | O; T; N R: 8-25-50 S: (1/2-)45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R25-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R25 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R22 | |
| 007-013-00-0 | 1,2-dimetilhidrazina | E | - | 540-73-8 | Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53 | T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-51/53 3 % ≤ C < 25 %: T; R45-20/21/22-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %: T; R45 | |
| 007-017-00-2 | nitrito de isobutilo | E | 208-819-7 | 542-56-3 | F; R11 Xn; R20/22 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 | F; T R: 11-20/22-45-68 S: 53-45 | | |
| 007-027-00-7 | 1,6-bis(3,3-bis(1-metilpentilidenedimino)propil)ureido)hexano | | 420-190-2 | - | Xn; R21/22-48/21 C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 21/22-34-43-48/21-50/53 S: (1/2-)7-26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 008-003-00-9 | peróxido de hidrógeno en disolución ... % agua oxigenada ... % | B | 231-765-0 | 7722-84-1 | R5 O; R8 C; R35 Xn; R20/22 | O; C R: 5-8-20/22-35 S: (1/2-)17-26-28-36/37/39-45 | C ≥ 70 %: C; R20/22-35 50 % ≤ C < 70 %: C; R20/22-34 35 % ≤ C < 50 %: Xn; R22-37/38-41 8 % ≤ C < 35 %: Xn; R22-41 5 % ≤ C < 8 %: Xi; R36 Footnote: : C ≥ 70 %: R5, O; R8 50 % ≤ C < 70 %: O; R8 | |
| 009-015-00-7 | difluoruro de sulfurilo | | 220-281-5 | 2699-79-8 | T; R23 Xn; R48/20 N; R50 | T; N R: 23-48/20-50 S: (1/2-)45-63-60-61 | | |
| 015-002-00-7 | fósforo rojo | | 231-768-7 | 7723-14-0 | F; R11 R16 R52-53 | F R: 11-16-52/53 S: (2-)7-43-61 | | |
| 015-014-00-2 | fosfato de tributilo | | 204-800-2 | 126-73-8 | Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 Xi; R38 | Xn R: 22-38-40 S: (2-)36/37-46 | | |
| 015-015-00-8 | fosfatos de tritolilo fosfatos de tricresilo o-o-o, o-o-m, o-o-p, o-m-m, o-m-p, o-p-p | C | 201-103-5 | 78-30-8 | T; R39/23/24/25 N; R51-53 | T; N R: 39/23/24/25-51/53 S: (1/2-)20/21-28-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R39/23/24/25-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R39/23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R39/23/24/25 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R68/20/21/22 | |
| 015-016-00-3 | fosfatos de tritolilo fosfatos de tricresilo m-m-m, m-m-p, m-p-p, p-p-p | C | 201-105-6 | 78-32-0 | Xn; R21/22 N; R51-53 | Xn; N R: 21/22-51/53 S: (2-)28-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-51/53 5 % ≤ C < 25 %: Xn; R21/22-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53 | |
| 015-020-00-5 | mevinfos (ISO) fosfato de 2-metoxicarbonil-1-metilvinilo y de dimetilo 2-metoxicarbonil-1-metilvinilo fosfato de dimetilo | | 232-095-1 | 7786-34-7 | T+; R27/28 N; R50-53 | T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61 | C ≥ 7 %: T+; N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,0025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53 | |
| 015-021-00-0 | triclorfon (ISO) 2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfonato de dimetilo | | 200-149-3 | 52-68-6 | Xn; R22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 0,2 % ≤ C < 25 %: N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 0,2 %: N; R50-53 | |
| 015-027-00-3 | sulfotep (ISO) ditiopirofosfato de O,O,O,O-tetraetilo | | 222-995-2 | 3689-24-5 | T+; R27/28 N; R50-53 | T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61 | C ≥ 7 %: T+; N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-----------|--|---|---|---|
| 015-032-00-0 | protoato (ISO) ditioposfato de <i>O,O</i> -dietilo y isopropilcarbamoilmetilo | | 218-893-2 | 2275-18-5 | T+; R27/28 R52-53 | T+ R: 27/28-52/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61 | | |
| 015-033-00-6 | forato (ISO) ditioposfato de <i>O,O</i> -dietilo y etilmetilo | | 206-052-2 | 298-02-2 | T+; R27/28 N; R50-53 | T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 7%: T+, N; R27/28-50-53 1% ≤ C < 7%: T, N; R24/25-50-53 0,1% ≤ C < 1%: Xn, N; R21/22-50-53 0,025% ≤ C < 0,1%: N; R50-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: N; R51-53 0,00025% ≤ C < 0,0025%: R52-53 | |
| 015-034-00-1 | paration (ISO) tiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo y <i>O</i> -4-nitrofenilo | | 200-271-7 | 56-38-2 | T+; R26/28 T; 24-48/25 N; R50-53 | T+; N R: 24-26/28-48/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25%: T+, N; R24-26/28-48/25-50-53 10% ≤ C < 25%: T+, N; R21-26/28-48/25-50-53 7% ≤ C < 10%: T+, N; R21-26/28-48/25-50-53 3% ≤ C < 7%: T, N; R21-23/25-48/25-50-53 1% ≤ C < 3%: T, N; R23/25-48/25-50-53 0,25% ≤ C < 1%: Xn, N; R20/22-50-53 0,1% ≤ C < 0,25%: Xn, N; R20/22-51-53 0,025% ≤ C < 0,1%: N; R51-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: R52-53 | |
| 015-035-00-7 | paration - metil (ISO) tiofosfato de <i>O,O</i> -dimetilo y de <i>O</i> -4-nitrofenilo | | 206-050-1 | 298-00-0 | R5 R10 T+; R26/28 T; R24 Xn; R48/22 N; R50-53 | T+; N R: 5-10-24-26/28-48/22-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25%: T+, N; R24-26/28-48/22-50-53 10% ≤ C < 25%: T+, N; R21-26/28-48/22-50-53 7% ≤ C < 10%: T+, N; R21-26/28-48/22-50-53 3% ≤ C < 7%: T, N; R21-23/25-50-53 1% ≤ C < 3%: T, N; R23/25-50-53 0,25% ≤ C < 1%: Xn, N; R20/22-50-53 0,1% ≤ C < 0,25%: Xn, N; R20/22-51-53 0,025% ≤ C < 0,1%: N; R51-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: R52-53 | |
| 015-041-00-X | malation (ISO) (dimetoxifosfinotio) succinato de dietilo ditioposfato de 1,2-bis(etoxicarbonil)etilo y de <i>O,O</i> -dimetil[(dimetoxifosfinotio) succinato de dietilo | | 204-497-7 | 121-75-5 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24-60-61 | C ≥ 25%: Xn, N; R22-50-53 0,25% ≤ C < 25%: N; R50-53 0,025% ≤ C < 0,25%: N; R51-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: R52-53 | |
| 015-042-00-5 | tiofosfato de <i>O,O</i> -dimetilo y de <i>O</i> -(3-cloro-4-nitrofenilo) clortion (nombre común no adoptado por ISO) | | 207-902-5 | 500-28-7 | Xn; R20/21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)13-60-61 | C ≥ 25%: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,25% ≤ C < 25%: N; R50-53 0,025% ≤ C < 0,25%: N; R51-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: R52-53 | |
| 015-047-00-2 | etion (ISO) <i>S,S</i> -metilendi (ditioposfato) de <i>O,O,O',O'</i> -tetraetilo | | 209-242-3 | 563-12-2 | T; R25 Xn; R21 N; R50-53 | T; N R: 21-25-50/53 S: (1/2-)25-36/37-45-60-61 | C ≥ 25%: T, N; R21-25-50-53 3% ≤ C < 25%: Xn, N; R22-50-53 0,0025% ≤ C < 3%: N; R50-53 0,00025% ≤ C < 0,0025%: N; R51-53 0,000025% ≤ C < 0,00025%: R52-53 | |
| 015-052-00-X | fenclorfos (ISO) fenclorfos (DCI) tiofosfato de <i>O,O</i> -dimetilo y de <i>O</i> -2,4,5-triclorofenilo | | 206-082-6 | 299-84-3 | Xn; R21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61 | | |
| 015-055-00-6 | naled (ISO) fosfato de 1,2-dibromo-2,2-dicloroetilo y de dimetilo | | 206-098-3 | 300-76-5 | Xn; R21/22 Xi; R36/38 N; R50 | Xn; N R: 21/22-36/38-50 S: (2-)36/37-61 | C ≥ 25%: Xn, N; R21/22-36/38-50 20% ≤ C < 25%: Xi, N; R36/38-50 0,025% ≤ C < 20%: N; R50 | |
| 015-063-00-X | dioxation (ISO) (DCI) di(ditioposfato) de 1,4-dioxano-2,3-diilo y de <i>O,O,O',O'</i> -tetraetilo | | 201-107-7 | 78-34-2 | T+; R26/28 T; R24 N; R50-53 | T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25%: T+, N; R24-26/28-50-53 7% ≤ C < 25%: T+, N; R21-26/28-50-53 3% ≤ C < 7%: T, N; R21-23/25-50-53 1% ≤ C < 3%: T, N; R23/25-50-53 0,1% ≤ C < 1%: Xn, N; R20/22-50-53 0,025% ≤ C < 0,1%: N; R50-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: N; R51-53 0,00025% ≤ C < 0,0025%: R52-53 | |
| 015-065-00-0 | ditioposfato de <i>O,O</i> -dimetilo y de <i>S</i> -(2-etilsulfonil)-etilo | | - | 2703-37-9 | T+; R26/27/28 N; R51-53 | T+; N R: 26/27/28-51/53 S: (1/2-)13-28-45-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|---|---|--|---|
| 015-076-00-0 | tiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo y de <i>O</i> -(4-metil-7-cumarinilo) | | - | 299-45-6 | T+; R26/27/28 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61 | C ≥ 7 %: T+, N; R26/27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |
| 015-078-00-1 | demeton- <i>S</i> -metilsulfona tiofosfato de <i>S</i> -2-etilsulfoniletilo y de dimetilo | | 241-109-5 | 17040-19-6 | T; R25 Xn; R21 N; R51-53 | T; N R: 21-25-51/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-61 | | |
| 015-083-00-9 | bensulida (ISO) ditiofosfato de 2-fenilsulfonamidoetilo y de <i>O,O</i> -diisopropilo | | 212-010-4 | 741-58-2 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24-36-60-61 | | |
| 015-084-00-4 | clorpirifos (ISO) tiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo y de <i>O</i> -3,5,6-tricloro-2-piridilo | | 220-864-4 | 2921-88-2 | T; R25 N; R50-53 | T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,0025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53 | |
| 015-095-00-4 | metamidofos (ISO) tiofosforamidoato de <i>O,S</i> -dimetilo | | 233-606-0 | 10265-92-6 | T+; R26/28 T; R24 N; R50 | T+; N R: 24-26/28-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61 | | |
| 015-096-00-X | oxidisulfoton ditiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo y de <i>S</i> -(2-etilsulfonil)etilo | | 219-679-1 | 2497-07-6 | T+; R28 T; R24 N; R50-53 | T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R24-28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53 | |
| 015-097-00-5 | fentoato (ISO) 2-(dimetoxifosfinito)il-2-fenilacetato de etilo | | 219-997-0 | 2597-03-7 | Xn; R21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-100-00-X | foxim (ISO) (DCI) α - (dietoxifosfinito)ilimino)fenilacetoneitrilo | | 238-887-3 | 14816-18-3 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)36-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,025 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |
| 015-101-00-5 | fosmet (ISO) ditiofosfato de ftalimidometilo y de <i>O,O</i> -dimetilo | | 211-987-4 | 732-11-6 | Xn; R21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-105-00-7 | fosfito de trifenilo | | 202-908-4 | 101-02-0 | Xi; R36/38 N; R50-53 | Xi; N R: 36/38-50/53 S: (2-)28-60-61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/38-50-53 5 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 015-107-00-8 | etoprofos (ISO) ditiofosfato de etilo y de <i>S,S</i> -dipropilo | | 236-152-1 | 13194-48-4 | T+; R26/27 T; R25 R43 N; R50-53 | T+; N R: 25-26/27-43-50/53 S: (1/2-)27/28-36/37/39-45-60-61 | | |
| 015-108-00-3 | bromofos (ISO) tiofosfato de <i>O</i> -4-bromo-2,5-diclorofenilo y de <i>O,O</i> -dimetilo | | 218-277-3 | 2104-96-3 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)36-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-109-00-9 | crotofos (ISO) 3-(dimetoxifosfinito)iloxi) isocrotonato de 1-feniletilo | | 231-720-5 | 7700-17-6 | T; R24/25 N; R50-53 | T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 015-110-00-4 | cianofenos (ISO) feniltiofosfonato de <i>O</i> -4-cianofenilo y de <i>O</i> -etilo | | - | 13067-93-1 | T; R25-39/25 Xn; R21 Xi; R36 N; R51-53 | T; N R: 21-25-36-39/25-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61 | | |
| 015-114-00-6 | clormefos (ISO) ditiofosfato de <i>S</i> -clorometilo y de <i>O,O</i> -dietilo | | 246-538-1 | 24934-91-6 | T+; R27/28 N; R50-53 | T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 015-115-00-1 | clortiofos (ISO) | | 244-663-6 | 21923-23-9 | T+; R28 T; R24 N; R50-53 | T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|--------------------------------|--|--|---|
| 015-122-00-X | tiofosfato de <i>O</i> -6-etoxi-2-etilpirimidin-4-ilo y de <i>O</i> , <i>O</i> -dimetilo etrimfos | | 253-855-9 | 38260-54-7 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 015-123-00-5 | fenamifos (ISO) <i>N</i> -isopropilfosforamidato de etilo y de 4-metil- <i>m</i> -tolilo | | 244-848-1 | 22224-92-6 | T+; R28 T; R24 N; R50-53 | T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R24-28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R21-28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T; N; R21-25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T; N; R25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-126-00-1 | heptenofos (ISO) fosfato de 7-clorobis(3.2.0)hepta-2,6-dien-6-ilo y de dimetilo | | 245-737-0 | 23560-59-0 | T; R25 N; R50-53 | T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)23-28-37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-127-00-7 | tiofosfato de <i>S</i> -bencilo y de diisopropilo iprobenfos | | 247-449-0 | 26087-47-8 | Xn; R22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61 | | |
| 015-128-00-2 | ditiofosfato de <i>S</i> -etilsulfonilmetilo y de <i>O</i> , <i>O</i> -diisopropilo | | - | 5827-05-4 | T+; R27 T; R25 N; R50-53 | T+; N R: 25-27-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R25-27-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 3 % ≤ C < 7 %: T; N; R22-24-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R22-27-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T; N; R24-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R21-51-53 | |
| 015-129-00-8 | isofenfos (ISO) <i>N</i> -isopropiltiofosforamidato de <i>O</i> -etilo y de <i>O</i> -2-isopropoxicarbonilfenilo | | 246-814-1 | 25311-71-1 | T; R24/25 N; R50-53 | T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-131-00-9 | tiofosfato de <i>O</i> , <i>O</i> -dietilo y de <i>O</i> -5-fenilisoaxazol-3-ilo | | 242-624-8 | 18854-01-8 | T; R24/25 N; R50-53 | T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 015-132-00-4 | ditiofosfato de <i>S</i> -(clorofeniltiometyl) y de <i>O</i> , <i>O</i> -dimetilo | | - | 953-17-3 | T; R24/25 N; R50-53 | T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |
| 015-133-00-X | piperofos (ISO) ditiofosfato de <i>S</i> -2-metilpiperidinocarbonilmetil- <i>O</i> , <i>O</i> -dipropilo | | - | 24151-93-7 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 015-134-00-5 | pirimifos-metil (ISO) tiofosfato de <i>O</i> -(2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-ilo) y de <i>O</i> , <i>O</i> -dimetilo | | 249-528-5 | 29232-93-7 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61 | | |
| 015-135-00-0 | tiofosfato de <i>O</i> -(4-bromo-2-clorofenilo) de <i>O</i> -etilo y de <i>S</i> -propilo profenofos (ISO) | | 255-255-2 | 41198-08-7 | Xn; R20/21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)36/37-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |
| 015-136-00-6 | (etilamido)tiofosfato de <i>O</i> -etilo y de <i>O</i> -[(2-isopropoxicarboni)-1-metil]vinilo crotonato de <i>trans</i> -isopropil-3-[(etilamino)metoxifosfinotioil]oxi | | 250-517-2 | 31218-83-4 | T; R25 N; R50-53 | T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 015-138-00-7 | quinalfos (ISO) tiofosfato de <i>O</i> , <i>O</i> -dietilo y de <i>O</i> -quinoxalin-2-ilo | | 237-031-6 | 13593-03-8 | T; R25 Xn; R21 N; R50-53 | T; N R: 21-25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R21-25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |
| 015-139-00-2 | tiofosfato de <i>S</i> - <i>tert</i> -butiltiometyl y de <i>O</i> , <i>O</i> -dietilo terbufos (ISO) | | 235-963-8 | 13071-79-9 | T+; R27/28 N; R50-53 | T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61 | C ≥ 7 %: T+; N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T; N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|--|---|--|---|
| 015-154-00-4 | ácido 2-cloroetilfosfónico | | 240-718-3 | 16672-87-0 | Xn; R20/21 C; R34 R52-53 | C R: 20/21-34-52/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: C; R20/21-34-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 | |
| 015-179-00-0 | Producto de condensación UVCB de: cloruro de tetraquis-hidroximetilfosfonio, urea y C16-18 sebo-alkilamina hidrogenada destilada | | 422-720-8 | 166242-53-1 | Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 22-34-40-43-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 016-001-00-4 | sulfuro de hidrógeno | | 231-977-3 | 7783-06-4 | F+; R12 T+; R26 N; R50 | F+; T+; N R: 12-26-50 S: (1/2-)9-16-28-36/37-45-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R26-50 10 % ≤ C < 25 %: T+; R26 5 % ≤ C < 10 %: T; R23 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R20 | |
| 016-008-00-2 | polisulfuros de amonio | | 232-989-1 | 9080-17-5 | R31 C; R34 N; R50 | C; N R: 31-34-50 S: (1/2-)26-45-61 | C ≥ 25 %: C; N; R31-34-50 5 % ≤ C < 25 %: C; R31-34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R31-36/38 | |
| 016-012-00-4 | dicloruro de diazufre monocloruro de azufre | | 233-036-2 | 10025-67-9 | R14 T; R25 Xn; R20 R29 C; R35 N; R50 | T; C; N R: 14-20-25-29-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: T; C; N; R20-25-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R22-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R22-34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R22-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38 | |
| 016-013-00-X | dicloruro de azufre | | 234-129-0 | 10545-99-0 | R14 C; R34 Xi; R37 N; R50 | C; N R: 14-34-37-50 S: (1/2-)26-45-61 | C ≥ 25 %: C; N; R34-50 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 | |
| 016-014-00-5 | tetracloruro de azufre | | - | 13451-08-6 | R14 C; R34 N; R50 | C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-45-61 | C ≥ 25 %: C; N; R34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 | |
| 016-021-00-3 | metanotiol metilmercaptano | | 200-822-1 | 74-93-1 | F+; R12 T; R23 N; R50-53 | F+; T; N R: 12-23-50/53 S: (2-)16-25-60-61 | | |
| 016-023-00-4 | sulfato de dimetilo | E | 201-058-1 | 77-78-1 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T+; R26 T; R25 C; R34 R43 | T+ R: 45-25-26-34-43-68 S: 53-45 | C ≥ 25 %: T+; R45-R25-R26-R34- R43-R68 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-R22- R26-R34-R43-R68 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-R22- R26-R36/37/38-R43-R68 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-R22-R23- R36/37/38-R43-R68 3 % ≤ C < 5 %: T; R45-R22-R23- R43-R68 1 % ≤ C < 3 %: T; R45-R23-R43- R68 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-R20-R68 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45-R68 | |
| 016-059-00-0 | <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilditiobis(etilen)diamina, diclorhidrato | | 405-300-9 | 17339-60-5 | Xn; R22 Xi; R36 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-36-43-50/53 S: (2-)26-36/37-60-61 | | |
| 017-003-00-8 | clorato de bario | | 236-760-7 | 13477-00-4 | O; R9 Xn; R20/22 N; R51-53 | O; Xn; N R: 9-20/22-51/53 S: (2-)13-27-61 | | |
| 017-004-00-3 | clorato de potasio | | 223-289-7 | 3811-04-9 | O; R9 Xn; R20/22 N; R51-53 | O; Xn; N R: 9-20/22-51/53 S: (2-)13-16-27-61 | | |
| 017-005-00-9 | clorato de sodio | | 231-887-4 | 7775-09-9 | O; R9 Xn; R22 N; R51-53 | O; Xn; N R: 9-22-51/53 S: (2-)13-17-46-61 | | |
| 017-011-00-1 | hipoclorito de sodio, solución ... % cloro activo hipoclorito de sodio, disolución ... % cloro activo | B | 231-668-3 | 7681-52-9 | C; R34 R31 N; R50 | C; N R: 31-34-50 S: (1/2-)28-45-50-61 | C ≥ 25 %: C; N; R31-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R31-34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R31-36/38 | |
| 017-012-00-7 | hipoclorito de calcio | | 231-908-7 | 7778-54-3 | O; R8 Xn; R22 R31 C; R34 N; R50 | O; C; N R: 8-22-31-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: C; N; R22-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 3 % ≤ C < 10 %: Xi; R37/38-41 0,5 % ≤ C < 3 %: Xi; R36 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|----------------------|---|-----------|------------|---|--|---|---|
| 024-001-00-0 | trióxido de cromo | E | 215-607-8 | 1333-82-0 | O; R9 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 3; R62 T+; R26 T; R24/25-48/23 C; R35 R42/43 N; R50-53 | O; T+; N R: 45-46-9-24/25-26-35-42/43-48/23-62-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R24/25-26-35-42/43-45-46-48/23-50/53-62 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R24/25-26-35-42/43-45-46-48/23-51/53-62 5 % ≤ C < 10 %: T+, N; R24/25-26-34-42/43-45-46-48/20-51/53-62 3 % ≤ C < 5 %: T+, N; R24/25-26-36/37/38-42/43-45-46-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T+, N; R26-36/37/38-42/43-45-46-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26-36/37/38-42/43-45-46-48/20-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46 | |
| 024-002-00-6 | dicromato de potasio | E | 231-906-6 | 7778-50-9 | O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; 50-53 | T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20 | 3 |
| 024-003-00-1 | dicromato de amonio | E | 232-143-1 | 7789-09-5 | E; R2 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53 | E; T+; N R: 45-46-60-61-2-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-50/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-50/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20 | 3 |
| 024-004-00-7 | dicromato de sodio | E | 234-190-3 | 10588-01-9 | O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; 50-53 | T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20 | 3 |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------|---|--|--|---|
| 024-004-01-4 | dicromato de sodio, dihidrato | E | 234-190-3 | 7789-12-0 | O; R8 Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53 | T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20 | 3 |
| 024-011-00-5 | bis(1-(3,5-dinitro-2-óxidofenilazo)-3-(N-fenilcarbamoil)-2-naftolato)cromato(1-) de amonio | | 400-110-2 | - | F; R11 N; R50-53 | F; N R: 11-50/53 S: (2-)33-60-61 | | |
| 024-018-00-3 | cromato sodico | E | 231-889-5 | 7775-11-3 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat.2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53 | T+; N R: 45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20 | 3 |
| 027-004-00-5 | dicloruro de cobalto | E | 231-589-4 | 7646-79-9 | Carc. Cat. 2; R49 Xn; R22 R42/43 N; R50-53 | T; N R: 49-22-42/43-50/53 S: (2-)22-53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R49-22-42/43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R49-22-42/43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R49-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R49-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R49 | 1 |
| 027-005-00-0 | sulfato de cobalto | E | 233-334-2 | 10124-43-3 | Carc. Cat. 2; R49 Xn; R22 R42/43 N; R50-53 | T; N R: 49-22-42/43-50/53 S: (2-)22-53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R49-22-42/43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R49-42/43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R49-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R49-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R49 | 1 |
| 029-002-00-X | óxido de cobre (I) óxido cuproso | | 215-270-7 | 1317-39-1 | Xn; R22 N; 50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-60-61 | | |
| 030-001-00-1 | cinc en polvo (piroforico) | | 231-175-3 | 7440-66-6 | F; R15-17 N; R50-53 | F; N R: 15-17-50/53 S: (2-)43-46-60-61 | | |
| 030-002-00-7 | cinc en polvo (estabilizado) | | 231-175-3 | 7440-66-6 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 030-003-00-2 | cloruro de cinc | | 231-592-0 | 7646-85-7 | Xn; R22 C; R34 N; R50-53 | C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 030-006-00-9 | sulfato de cinc (hidrato) (mono-, hexa-, y hepta- hidrato) [1] sulfato de cinc (anhidro) [2] | | 231-793-3 [1] 231-793-3 [2] | 7446-19-7 [1] 7733-02-0 [2] | Xn; R22 R41 N; R50-53 | Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-46-60-61 | | |
| 033-001-00-X | arsénico | | 231-148-6 | 7440-38-2 | T; R23/25 N; R50-53 | T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)20/21-28-45-60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|--|---|---|
| 033-002-00-5 | compuestos de arsénico, exceptos aquellos que expresamente están indicados en este Anexo | A | - | - | T; R23/25 N; R50-53 | T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)20/21-28-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/25-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/25 0,1 % ≤ C < 0,2 %: Xn; R20/22 | 1 |
| 042-002-00-4 | hexa-μ-oxotetra-μ3-oxodi-μ5-oxotetradecaooxotamolibdato(4-) de tetrakis(dimetiliditradecilamonio) | | 404-760-8 | 117342-25-3 | T; R23 Xi; R41 R53 | T R: 23-41-53 S: (1/2-)26-37/39-45-61 | | |
| 048-001-00-5 | compuestos de cadmio, excepto el sulfoseleniuro (xCdS.yCdSe), el sulfuro mixto de cadmio-cinc (xCdS.yZnS), el sulfuro mixto de cadmio y mercurio (xCdS.yHgS) y de los especialmente citados en este Anexo | A | - | - | Xn; R20/21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22 | 1 |
| 048-003-00-6 | diformiato de cadmio | | 224-729-0 | 4464-23-7 | T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53 | T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)22-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/22-33-52/53 | |
| 048-004-00-1 | cianuro de cadmio | | 208-829-1 | 542-83-6 | T+; R26/27/28 R32 R33 Xn; R68 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-32-33-68-50/53 S: (1/2-)7-28-29-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R26/27/28-32-33-50/53-68 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R26/27/28-32-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-32-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-32-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33 | |
| 048-005-00-7 | hexafluorosilicato(2-) de cadmio | | 241-084-0 | 17010-21-8 | T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53 | T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)22-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/22-33 | |
| 048-006-00-2 | fluoruro de cadmio | E | 232-222-0 | 7790-79-6 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23/25 N; R50-53 | T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 048-007-00-8 | ioduro de cadmio | | 232-223-6 | 7790-80-9 | T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53 | T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)22-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/22-33 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--------------------------------------|--|--|---|---|---|
| 048-008-00-3 | cloruro de cadmio | E | 233-296-7 | 10108-64-2 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23/25 N; R50-53 | T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T; N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 048-009-00-9 | sulfato de cadmio | E | 233-331-6 | 10124-36-4 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T; R48/23/25 T+; R26 T; R25 N; R50-53 | T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T; N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 048-010-00-4 | sulfuro de cadmio | E | 215-147-8 | 1306-23-6 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 Xn; R22 R53 | T; N R: 45-22-48/23/25-62-63-68-53 S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T; R45-22-48/23/25-62-63-68-53 10 % ≤ C < 25 %: T; R45-22-48/23/25-62-63-68 5 % ≤ C < 10 %: T; R45-48/20/22-62-63-68 1 % ≤ C < 5 %: T; R45-48/20/22-68 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-48/20/22 | 1 |
| 050-001-00-5 | tetracloruro de estaño cloruro estánnico | | 231-588-9 | 7646-78-8 | C; R34 R52-53 | C R: 34-52/53 S: (1/2-)/7/8-26-45-61 | C ≥ 25 %: C; R34-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 | |
| 050-005-00-7 | compuestos de trimetilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T+; R26/27/28 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)/26-27-28-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R26/27/28-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+; N; R26/27/28-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22 | 1 |
| 050-006-00-2 | compuestos de trietilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T+; R26/27/28 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)/26-27-28-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R26/27/28-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+; N; R26/27/28-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22 | 1 |
| 050-007-00-8 | compuestos de tripopilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T; R23/24/25 N; R50-53 | T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)/26-27-28-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R23/24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; N; R23/24/25-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22 | 1 |
| 050-008-00-3 | compuestos de tributilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T; R25-48/23/25 Xn; R21 Xi; R36/38 N; R50-53 | T; N R: 21-25-36/38-48/23/25-50/53 S: (1/2-)/35-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; N; R21-25-36/38-48/23/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; N; R21-25-36/38-48/23/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R21-25-36/38-48/23/25-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R22-48/20/22-52/53 | 1 |
| 050-009-00-9 | fluorotripentilestannano [1] hexapentildiestannoxano [2] | | 243-546-7 [1] 247-143-7 [2] | 20153-49-5 [1] 25637-27-8 [2] | Xn; R20/21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)/26-28-60-61 | C ≥ 25 %: Xn; N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn; N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | 1 |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|---|---|--|---|---|---|
| 050-010-00-4 | fluorotrihexilestannano | | 243-547-2 | 20153-50-8 | Xn; R20/21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | 1 |
| 050-011-00-X | compuestos de trifenilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T; R23/24/25 N; R50-53 | T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)26-27-28-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/24/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-52/53 | 1 |
| 050-012-00-5 | tetraciclohexilestannano [1] clorotriciclohexilestannano [2] butiltriciclohexilestannano [3] | A | 215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3] | 1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3] | Xn; R20/21/22 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | 1 |
| 050-013-00-0 | compuestos de trioctilestaño, excepto aquellos específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | Xi; R36/37/38 R53 | Xi R: 36/37/38-53 S: (2-)61 | C ≥ 25 %: Xi; R36/37/38-53 1 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38 | 1 |
| 051-002-00-3 | pentacloruro de antimonio | | 231-601-8 | 7647-18-9 | C; R34 N; R51-53 | C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)26-45-61 | C ≥ 25 %: C, N; R34-51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-52/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53 | |
| 051-003-00-9 | compuestos de antimonio, excepto el tetróxido (Sb ₂ O ₄), el pentóxido (Sb ₂ O ₅), el trisulfuro (Sb ₂ S ₃), el pentasulfuro (Sb ₂ S ₅) y los especialmente expresados en este Anexo | A | - | - | Xn; R20/22 N; R51-53 | Xn; N R: 20/22-51/53 S: (2-)61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22 | 1 |
| 080-002-00-6 | compuestos inorgánicos de mercurio, excepto el sulfuro mercurico (cinabrio) y los específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T+; R26/27/28 R33 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-33-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,5 % ≤ C < 2 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33 | 1 |
| 080-004-00-7 | compuestos orgánicos de mercurio, excepto los específicamente expresados en este Anexo | A | - | - | T+; R26/27/28 R33 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-36-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-33-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,05 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33 | 1 |
| 080-007-00-3 | dimetilmercurio [1] dietilmercurio [2] | | 209-805-3 [1] 211-000-7 [2] | 593-74-8 [1] 627-44-1 [2] | T+; R26/27/28 R33 N; R50-53 | T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-36-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-33-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25-33 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22-33 | 1 |
| 082-001-00-6 | compuestos de plomo, excepto de los especialmente expresados en este Anexo | AE | - | - | Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/22 R33 N; R50-53 | T; N R: 61-20/22-33-62-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R61-20/22-33-62-50/53 5 % ≤ C < 25 %: T, N; R61-20/22-33-62-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R61-20/22-33-62-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R61-20/22-33-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R61-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: R52/53 | 1 |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|--------------------------------------|--|--|--|--|---|
| 082-002-00-1 | derivados de alquilplomo | AE | - | - | Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 T+; R26/27/28 R33 N; R50-53 | T+; N R: 61-26/27/28-33-62-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R61-26/27/28-33-62-50/53 5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R61-26/27/28-33-62-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T+, N; R61-26/27/28-33-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R61-26/27/28-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R61-26/27/28-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R61-23/24/25-33 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22-33 | 1 |
| 601-010-00-3 | eteno etileno | | 200-815-3 | 74-85-1 | F+; R12 R67 | F+ R: 12-67 S: (2-)9-16-33-46 | | |
| 601-014-00-5 | isopreno 2-metil-1,3-butadieno | D | 201-143-3 | 78-79-5 | F+; R12 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 R52-53 | F+; T R: 45-12-68-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 601-017-00-1 | ciclohexano | | 203-806-2 | 110-82-7 | F; R11 Xn; R65 Xi; R38 R67 N; R50-53 | F; Xn; N R: 11-38-65-67-50/53 S: (2-)9-16-25-33-60-61-62 | | 4 6 |
| 601-020-00-8 | benceno | E | 200-753-7 | 71-43-2 | F; R11 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 T; R48/23/24/25 Xn; R65 Xi; R36/38 | F; T R: 45-46-11-36/38-48/23/24/25-65 S: 53-45 | | |
| 601-021-00-3 | tolueno | | 203-625-9 | 108-88-3 | F; R11 Repr. Cat. 3; R63 Xn; R48/20-65 Xi; R38 R67 | F; Xn R: 11-38-48/20-63-65-67 S: (2-)36/37-62-46 | | 4, 6 |
| 601-025-00-5 | mesitileno | | 203-604-4 | 108-67-8 | R10 Xi; R37 N; R51-53 | Xi; N R: 10-37-51/53 S: (2-)61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R37-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53 | |
| 601-027-00-6 | 2-fenilpropeno α-metilestireno | | 202-705-0 | 98-83-9 | R10 Xi; R36/37 N; R51-53 | Xi; N R: 10-36/37-51/53 S: (2-)61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53 | |
| 601-028-00-1 | 2-metilestireno 2-viniltolueno | | 210-256-7 | 611-15-4 | Xn; R20 N; R51-53 | Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)24-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53 | |
| 601-032-00-3 | benzo[def]criseno benzo[a]pireno | | 200-028-5 | 50-32-8 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 R43 N; R50-53 | T; N R: 45-46-60-61-43-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R43-45-46-50-53-60-61 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R43-45-46-51-53-60-61 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R43-45-46-52-53-60-61 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-52-53-60-61 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 601-037-00-0 | n-hexano | | 203-777-6 | 110-54-3 | F; R11 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R65-48/20 Xi; R38 R67 N; R51-53 | F; Xn; N R: 11-38-48/20-62-65-67-51/53 S: (2-)9-16-29-33-36/37-61-62 | C ≥ 25 %: Xn, N; R38-48/20-62-51/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn; R38-48/20-62-52/53 5 % ≤ C < 20 %: Xn; R48/20-62-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53 | 4 6 |
| 601-041-00-2 | dibenzo[a,h]antraceno | | 200-181-8 | 53-70-3 | Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53 | T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R45 | |
| 601-048-00-0 | criseno | | 205-923-4 | 218-01-9 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 N; R50-53 | T; N R: 45-68-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 601-052-00-2 | naftaleno | | 202-049-5 | 91-20-3 | Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | | |
| 601-053-00-8 | nonilfenol [1] 4-nonilfenol, ramificado [2] | | 246-672-0 [1] 284-325-5 [2] | 25154-52-3 [1] 84852-15-3 [2] | Repr. Cat. 3; R62 Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 C; R34 N; R50-53 | C; N R: 22-34-62-63-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-46-60-61 | | |
| 602-003-00-8 | dibromometano | | 200-824-2 | 74-95-3 | Xn; R20 R52-53 | Xn R: 20-52/53 S: (2-)24-61 | C ≥ 25 %: Xn; R20-52/53 12,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--|--|--|---|---|---|
| 602-008-00-5 | tetracloruro de carbono tetraclorometano | | 200-262-8 | 56-23-5 | Carc. Cat. 3; R40 T; R23/24/25-48/23-59-52/53 R52-53 N; R59 | T; N R: 23/24/25-40-48/23-59-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-59-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-48/23-52/53-59 1 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/24/25-40-48/23-59 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/21/22-48/20-59 0,1 % ≤ C < 0,2 %: N; R59 | |
| 602-010-00-6 | 1,2-dibromoetano | E | 203-444-5 | 106-93-4 | Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R36/37/38 N; R51-53 | T; N R: 45-23/24/25-36/37/38-51/53 S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-36/37/38-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-23/24/25-36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 20 %: T, N; R45-23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 | |
| 602-011-00-1 | 1,1-dicloroetano | | 200-863-5 | 75-34-3 | F; R11 Xn; R22 Xi; R36/37 R52-53 | F; Xn R: 11-22-36/37-52/53 S: (2-)16-23-61 | C ≥ 25 %: Xn; R22-36/37-52/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn; R22-36/37 12,5 % ≤ C < 20 %: Xn; R22 | |
| 602-014-00-8 | 1,1,2-tricloroetano | | 201-166-9 | 79-00-5 | Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/21/22 R66 | Xn R: 20/21/22-40-66 S: (2-)9-36/37-46 | C ≥ 5 %: Xn; R20/21/22 | |
| 602-015-00-3 | 1,1,2,2-tetracloroetano tetracloruro de acetileno | | 201-197-8 | 79-34-5 | T+; R26/27 N; R51-53 | T+; N R: 26/27-51/53 S: (1/2-)38-45-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R26/27-51/53 7 % ≤ C < 25 %: T+; R26/27-52/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T; R23/24-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21 | |
| 602-016-00-9 | 1,1,2,2-tetrabromoetano | | 201-191-5 | 79-27-6 | T+; R26 Xi; R36 R52-53 | T+ R: 26-36-52/53 S: (1/2-)24-27-45-61 | C ≥ 25 %: T+; R26-36-52/53 20 % ≤ C < 25 %: T+; R26-36 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26 1 % ≤ C < 7 %: T; R23 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20 | |
| 602-017-00-4 | pentacloroetano | | 200-925-1 | 76-01-7 | Carc. Cat. 3; R40 T; R48/23 N; R51-53 | T; N R: 40-48/23-51/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R40-48/23-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R40-48/23-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R40-48/23 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20 | |
| 602-019-00-5 | 1-bromopropano bromuro de propilo | | 203-445-0 | 106-94-5 | F; R11 Rep. Cat. 2; R60 Rep. Cat. 3; R63 Xn; R48/20 Xi; R36/37/38 R67 | T; F R: 60-11-36/37/38-48/20-63-67 S: 53-45 | | |
| 602-025-00-8 | 1,1-dicloroetileno cloruro de vinilideno | D | 200-864-0 | 75-35-4 | F; R12 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20 | F+; Xn R: 12-20-40 S: (2-)7-16-29-36/37-46 | C ≥ 12,5 %: Xn; R20-40 1 % ≤ C < 12,5 %: Xn; R40 | |
| 602-026-00-3 | 1,2-dicloroetileno [1] cis-dicloroetileno [2] trans-dicloroetileno [3] | C | 208-750-2 [1] 205-859-7 [2] 205-860-2 [3] | 540-59-0 [1] 156-59-2 [2] 156-60-5 [3] | F; R11 Xn; R20 R52-53 | F; Xn R: 11-20-52/53 S: (2-)7-16-29-61 | C ≥ 25 %: Xn; R20-52/53 12,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20 | |
| 602-027-00-9 | tricloroetileno | | 201-167-4 | 79-01-6 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 R67 Xi; R36/38 R52-53 | T R: 45-36/38-67-68-52/53 S: 53-45-61 | | 6 |
| 602-029-00-X | 3-cloropropeno cloruro de alilo | D | 203-457-6 | 107-05-1 | F; R11 Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22-48/20 Xi; R36/37/38 N; R50 | F; Xn; N R: 11-20/21/22-36/37/38-40-48/20-68-50 S: (2-)16-25-26-36/37-46-61 | | |
| 602-033-00-1 | clorobenceno | | 203-628-5 | 108-90-7 | R10 Xn; R20 N; R51-53 | Xn; N R: 10-20-51/53 S: (2-)24/25-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20-51/53 5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53 | |
| 602-034-00-7 | 1,2-diclorobenceno o-diclorobenceno | | 202-425-9 | 95-50-1 | Xn; R22 Xi; R36/37/38 N; R50-53 | Xn; N R: 22-36/37/38-50/53 S: (2-)23-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-36/37/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-36/37/38-51/53 5 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R22-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 602-035-00-2 | 1,4-diclorobenceno p-diclorobenceno | | 203-400-5 | 106-46-7 | Xi; R36 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53 | Xn; N R: 36-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|--|---|---|---|
| 602-036-00-8 | 2-cloro-1,3-butadieno cloropreno | D E | 204-818-0 | 126-99-8 | F; R11 Carc. Cat. 2; R45 Xn; R20/22-48/20 Xi; R36/37/38 | F; T R: 45-11-20/22-36/37/38-48/20 S: 53-45 | | |
| 602-039-00-4 | bifenilos policlorados PCB | C | 215-648-1 | 1336-36-3 | R33 N; R50-53 | Xn; N R: 33-50/53 S: (2-)35-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R33-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R33-52/53 0,005 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R33 | |
| 602-043-00-6 | γ-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano lindano | | 200-401-2 | 58-89-9 | T; R25 Xn; R20/21-48/22 R64 N; R50-53 | T; N R: 20/21-25-48/22-64-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R20/21-25-48/22-64-50-53 10 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-48/22-64-50-53 3 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R22-64-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R64-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R64-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 602-062-00-X | 1,2,3-tricloropropano | D | 202-486-1 | 96-18-4 | Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R60 Xn; R20/21/22 | T R: 45-60-20/21/22 S: 53-45 | | |
| 602-073-00-X | 1,4-diclorobut-2-eno | E | 212-121-8 | 764-41-0 | Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50-53 | T+; N R: 45-24/25-26-34-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-24/25-26-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-21/22-26-34-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-21/22-26-36/37/38-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-21/22-23-36/37/38-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-21/22-23-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-23-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R45-20-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-20 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 603-006-00-7 | isómeros de pentanol, excepto de los especialmente expresados en este Anexo | C | 250-378-8 | 30899-19-5 | R10 Xn; R20 Xi; R37 R66 | Xn R: 10-20-37-66 S: (2-)46 | | |
| 603-007-00-2 | 2-metil-2-butanol alcohol terc-amílico | | 200-908-9 | 75-85-4 | F; R11 Xn; R20 Xi; R37/38 | F; Xn R: 11-20-37/38 S: (2-)46 | | |
| 603-029-00-2 | éter 2,2'-dicloroetilico bis-(2-cloroetil)éter | | 203-870-1 | 111-44-4 | R10 Carc. Cat. 3; R40 T+; R26/27/28 | T+ R: 10-26/27/28-40 S: (1/2-)7/9-27-28-36/37-45 | C ≥ 7 %: T+; R26/27/28-40 1 % ≤ C < 7 %: T; R23/24/25-40 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22 | |
| 603-030-00-8 | 2-aminoetanol etanolamina | | 205-483-3 | 141-43-5 | Xn; R20/21/22 C; R34 | C R: 20/21/22-34 S: (1/2-)26-36/37/39-45 | C ≥ 25 %: C; R20/21/22-34 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 | |
| 603-031-00-3 | 1,2-dimetoxietano éter dimetilico del etilenglicol | | 203-794-9 | 110-71-4 | Repr. Cat. 2; R60 Repr. Cat. 2; R61 F; R11 R19 Xn; R20 | F; T R: 60-61-11-19-20 S: 53-45 | | |
| 603-054-00-9 | éter di-n-butílico óxido de dibutilo | | 205-575-3 | 142-96-1 | R10 Xi; R36/37/38 R52-53 | Xi R: 10-36/37/38-52/53 S: (2-)61 | C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38 | |
| 603-063-00-8 | 2,3-epoxi-1-propanolglícol | E | 209-128-3 | 556-52-5 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 2; R60 T; R23 Xn; R21/22 Xi; R36/37/38 | T R: 45-60-21/22-23-36/37/38-68 S: 53-45 | | |
| 603-066-00-4 | 1-epoxietil-3,4-epoxiciclohexano diepóxido del vinilciclohexano | | 203-437-7 | 106-87-6 | T; R23/24/25 Xn; R68 | T R: 23/24/25-68 S: (1/2-)23-24-45 | C ≥ 1 %: T; R23/24/25-68 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22 | |
| 603-067-00-X | 1,2-epoxi-3-fenoxipropano óxido de glicidilo y de fenilo 2-3-epoxipropil fenil éter | E | 204-557-2 | 122-60-1 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R37/38 R43 R52-53 | T R: 45-20-37/38-43-68-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 603-070-00-6 | 2-amino-2-metilpropanol | | 204-709-8 | 124-68-5 | Xi; R36/38 R52-53 | Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)61 | C ≥ 25 %: Xi; R36/38-52/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/38 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|---|---|---|---|
| 603-074-00-8 | producto de reacción: bisfenol-A-epiclorhidrina resinas epoxi (peso molecular medio \leq 700) | | 500-033-5 | 25068-38-6 | Xi; R36/38 R43 N; R51-53 | Xi; N R: 36/38-43-51/53 S: (2-)28-37/39-61 | $C \geq 25\%$; Xi, N; R36/38-43-51/53 $5\% \leq C < 25\%$; Xi; R36/38-43-52/53 $2,5\% \leq C < 5\%$; Xi; R43-52/53 $1\% \leq C < 2,5\%$; Xi; R43 | |
| 603-076-00-9 | but-2-ino-1,4-diol 2-butino-1,4-diol | D | 203-788-6 | 110-65-6 | C; R34 T; R23/25 Xn; R21-48/22 R43 | C; T R: 21-23/25-34-43-48/22 S: (1/2-)25-26-36/37/39-45-46 | $C \geq 50\%$; T; R21-23/25-34-48/22-43 $25\% \leq C < 50\%$; T; R21-23/25-36/38-48/22-43 $10\% \leq C < 25\%$; Xn; R20/22-48/22-43 $3\% \leq C < 10\%$; Xn; R20/22-43 $1\% \leq C < 3\%$; R43 | |
| 603-095-00-2 | 2-(propiloxi)etanol | | 220-548-6 | 2807-30-9 | Xn; R21 Xi; R36 | Xn R: 21-36 S: (2-)26-36/37-46 | | |
| 603-105-00-5 | furano | E | 203-727-3 | 110-00-9 | F+; R12 R19 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22-48/22 Xi; R38 R52-53 | F+; T R: 45-12-19-20/22-38-48/22-68-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 604-001-00-2 | fenol ácido carbólico hidroxibenceno fenilalcohol | | 203-632-7 | 108-95-2 | Muta.Cat.3; R68 T; R23/24/25 Xn; R48/20/21/22 C; R34 | T; C R: 23/24/25-34-48/20/21/22-68 S: (1/2-)24/25-26-28-36/37/39-45 | $C \geq 10\%$; T; R23/24/25-48/20/21/22-34-68 $3\% \leq C < 10\%$; C; Xn; R20/21/22-34-68 $1\% \leq C < 3\%$; Xn; R36/38-68 | |
| 604-009-00-6 | pirogalol 1,2,3-trihidroxibenceno | | 201-762-9 | 87-66-1 | Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22 R52-53 | Xn R: 20/21/22-68-52/53 S: (2-)36/37-61 | $C \geq 25\%$; Xn; R20/21/22-68-52/53 $10\% \leq C < 25\%$; Xn; R20/21/22-68 $1\% \leq C < 10\%$; Xn; R68 | |
| 604-010-00-1 | 1,3-bencenodiol resorcinol | | 203-585-2 | 108-46-3 | Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50 | Xn; N R: 22-36/38-50 S: (2-)26-61 | $C \geq 25\%$; Xn, N; R22-36/38-50 $20\% \leq C < 25\%$; Xn; R22-36/38 $10\% \leq C < 20\%$; Xn; R22 | |
| 604-013-00-8 | 2,3,4,6-tetraclorofenol | | 200-402-8 | 58-90-2 | T; R25 Xi; R36/38 N; R50-53 | T; N R: 25-36/38-50/53 S: (1/2-)26-28-37-45-60-61 | $C \geq 25\%$; T, N; R25-36/38-50/53 $5\% \leq C < 20\%$; T, N; R25-36/38-51/53 $20\% \leq C < 25\%$; T, N; R25-51/53 $2,5\% \leq C < 5\%$; Xn, N; R22-51/53 $0,5\% \leq C < 2,5\%$; Xn; R22-52/53 $0,25\% \leq C < 0,5\%$; R52/53 | |
| 604-014-00-3 | clorocresol 4-cloro- <i>m</i> -cresol 4-cloro-3-metilfenol | | 200-431-6 | 59-50-7 | Xn; R21/22 Xi; R41 R43 N; R50 | Xn; N R: 21/22-41-43-50 S: (2-)26-36/37/39-61 | $C \geq 25\%$; Xn, N; R21/22-41-43-50 $10\% \leq C < 25\%$; Xn; R21/22-41-43 $5\% \leq C < 10\%$; Xn; R21/22-36-43 $1\% \leq C < 5\%$; Xi; R43 | |
| 604-015-00-9 | 2,2'-metilen-bis(3,4,6-triclorofenol) hexaclorofeno | | 200-733-8 | 70-30-4 | T; R24/25 N; R50-53 | T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)20-37-45-60-61 | $C \geq 25\%$; T, N; R24/25-50/53 $2,5\% \leq C < 25\%$; T, N; R24/25-51/53 $2\% \leq C < 2,5\%$; T; R24/25-52/53 $0,25\% \leq C < 2\%$; Xn; R21/22-52/53 $0,2\% \leq C < 0,25\%$; Xn; R21/22 | |
| 604-017-00-X | 2,4,5-triclorofenol | | 202-467-8 | 95-95-4 | Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53 | Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61 | $C \geq 25\%$; Xn, N; R22-36/38-50/53 $20\% \leq C < 25\%$; Xn, N; R22-36/38-51/53 $5\% \leq C < 20\%$; Xn, N; R36/38-51/53 $2,5\% \leq C < 5\%$; N; R51/53 $0,25\% \leq C < 2,5\%$; R52/53 | |
| 604-030-00-0 | bisfenol A 4,4'-isopropilidendifenol | | 201-245-8 | 80-05-7 | Repr. Cat. 3; R62 Xi; R37-41 R43 | Xi R: 37-41-43-62 S: (2-)26-36/37-39-46 | | |
| 604-050-00-X | 4-cloro- <i>o</i> -cresol 4-cloro-2-metil fenol | | 216-381-3 | 1570-64-5 | T; R23 C; R35 N; R50 | T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | $C \geq 25\%$; T, C, N; R23-35-50 $10\% \leq C < 25\%$; C; R20-35 $5\% \leq C < 10\%$; C; R20-34 $3\% \leq C < 5\%$; Xn; R20-36/37/38 $1\% \leq C < 3\%$; Xi; R36/37/38 | |
| 605-002-00-0 | 1,3,5-trioxano trioximetileno | | 203-812-5 | 110-88-3 | F; R11 Repr.Cat.3; R63 Xi; R37 | F; Xn R: 11-37-63 S: (2-)36/37-46 | | |
| 605-016-00-7 | glioxal...% | B | 203-474-9 | 107-22-2 | Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R36/38 R43 | Xn R: 20-36/38-43-68 S: (2-)36/37 | $C \geq 10\%$; Xn; R20-36/38-43-68 $1\% \leq C < 10\%$; Xn; R43-68 | |
| 605-020-00-9 | safrol 5-alil-1,3-benzodioxol | E | 202-345-4 | 94-59-7 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R22 | T R: 45-22-68 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--------------------------------------|------------------------------|---|--|---|---|
| 605-022-00-X | glutaral glutaraldehído 1,5-pentanodial | | 203-856-5 | 111-30-8 | T; R23/25 C; R34 R42/43 N; R50 | T; N R: 23/25-34-42/43-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 50 %: T, N; R23/25-34-42/43-50 25 % ≤ C < 50 %: T; R22-23-34-42/43 10 % ≤ C < 25 %: C; R20/22-34-42/43 2 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22-37/38-41-42/43 1 % ≤ C < 2 %: Xn; R36/37/38-42/43 0,5 % ≤ C < 1 %: Xi; R36/37/38-43 | |
| 605-025-00-6 | cloroacetaldehído | | 203-472-8 | 107-20-0 | Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50 | T+; N R: 24/25-26-34-40-50 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R24/25-26-34-40-50 10 % ≤ C < 25 %: T+; R21/22-26-34-40 7 % ≤ C < 10 %: T+; R21/22-26-36/37/38-40 5 % ≤ C < 7 %: T; R21/22-23-36/37/38-40 3 % ≤ C < 5 %: T; R21/22-23-40 1 % ≤ C < 3 %: T; R23-40 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20 | |
| 606-037-00-4 | triadimefon (ISO) 1-(4-clorotenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)-butanona 1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1H,1,2,4-triazol-1-il)-2butanona | | 256-103-8 | 43121-43-3 | Xn; R22 R43 N; R51-53 | Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 606-048-00-4 | 2'-anilino-3'-metil-6'-dipentilaminoespiro(isobenzofurano-1(1H),9'-xanten)-3-ona | | 406-480-1 | - | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-004-00-7 | ácido tricloroacético | | 200-927-2 | 76-03-9 | C; R35 N; R50-53 | C; N R: 35-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R35-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R35-51/53 5 % ≤ C < 10 %: C, N; R34-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/37/38-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | |
| 607-019-00-9 | cloroformiato de metilo | | 201-187-3 | 79-22-1 | F; R11 T+; R26 Xn; R21/22 C; R34 | F; T+ R: 11-21/22-26-34 S: (1/2-)26-14-28-36/37-39-36/37/39-45-46-63 | | |
| 607-049-00-2 | mecoprop (ISO) [1] y sus sales ácido 2-(4-cloro- <i>o</i> -toliloxi) propiónico ácido (<i>RS</i>)-2-(4-cloro- <i>o</i> -toliloxi) propiónico [1] ácido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico [2] | | 230-386-8 [1] 202-264-4 [2] | 7085-19-0 [1] 93-65-2 [2] | Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53 | Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)13-26-37/39-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-38-41-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R38-41-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xi, N; R41-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R37-50-53 0,25 % ≤ C < 5 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 607-053-00-4 | MCPB (ISO) ácido 4-(4-cloro- <i>o</i> -toliloxi) butírico | | 202-365-3 | 94-81-5 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-061-00-8 | ácido acrílico ácido 2-propenoico | D | 201-177-9 | 79-10-7 | R10 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50 | C; N R: 10-20/21/22-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: C, N; R20/21/22-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38 | |
| 607-064-00-4 | cloroformiato de bencilo | | 207-925-0 | 501-53-1 | C; R34 N; R50-53 | C; N R: 34-50/53 S: (1/2-)26-45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 607-072-00-8 | acrilato de 2-hidroxietilo | D | 212-454-9 | 818-61-1 | T; R24 C; R34 R43 N; R50 | T; N R: 24-34-43-50 S: (1/2-)26-36/39-45-61 | C ≥ 25 %: T; R24-34-43-50 10 % ≤ C < 25 %: T; R24-34-43 5 % ≤ C < 10 %: T; R24-36/38-43 2 % ≤ C < 5 %: T; R24-43 0,2 % ≤ C < 2 %: Xn; R21-43 | |
| 607-086-00-4 | ftalato de dialilo | | 205-016-3 | 131-17-9 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24/25-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 607-091-00-1 | ácido trifluoroacético . . . % | B | 200-929-3 | 76-05-1 | Xn; R20 C; R35 R52-53 | C R: 20-35-52/53 S: (1/2-)9-26-27-28-45-61 | C ≥ 25 %: C; R20-35-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/38 | |
| 607-094-00-8 | ácido peracético . . . % | | 201-186-8 | 79-21-0 | R10 O; R7 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50 | O; C; N R: 7-10-20/21/22-35-50 S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: C, N; R20/21/22-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R20/21/22-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38 | |
| 607-107-00-7 | acrilato de 2-etilhexilo | D | 203-080-7 | 103-11-7 | Xi; R37/38 R43 | Xn R: 37/38-43 S: (2-)36/37-46 | C ≥ 20 %: Xi; R37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|--|--|---|---|
| 607-113-00-X | metacrilato de isobutilo | D | 202-613-0 | 97-86-9 | R10 Xi; R36/37/38 R43 N; R50 | Xi; N R: 10-36/37/38-43-50 S: (2-)24-37-61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-43-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43 | |
| 607-116-00-6 | acrilato de ciclohexilo | D | 221-319-3 | 3066-71-5 | Xi; R37/38 N; R51-53 | Xi; N R: 37/38-51/53 S: (2-)61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R37/38-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: R52/53 | |
| 607-133-00-9 | monoalquil o monoaril o monoalquilaril ésteres del ácido acrílico excepto los especialmente citados en este Anexo | A | - | - | Xi; R36/37/38 N; R51-53 | Xi; N R: 36/37/38-51/53 S: (2-)26-28-61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: R52/53 | |
| 607-151-00-7 | propargita (ISO) sulfito de 2-(4- <i>terc</i> -butilfenoxi)ciclohexilo y de prop-2-inilo sulfito de 2-(4- <i>terc</i> -butilfenoxi)ciclohexilo y de 2 propinilo | | 219-006-1 | 2312-35-8 | Carc.Cat.3; R40 T; R23 Xi; R38-41 N; R50-53 | T; N R: 23-38-40-41-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23-38-40-41-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-38-40-41-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R20-40-41-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20-40-36-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20-40-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xn, N; R40-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R40-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 607-189-00-4 | ácido trimetilendiamintetraacético | | 400-400-9 | 1939-36-2 | Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53 | Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-60-61 | | |
| 607-244-00-2 | acrilato de isooctilo | | 249-707-8 | 29590-42-9 | Xi; R36/37/38 N; R50-53 | Xi; N R: 36/37/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 607-245-00-8 | acrilato de <i>terc</i> -butilo | D | 216-768-7 | 1663-39-4 | F; R11 Xn; R20/21/22 Xi; R37/38 R43 N; R52-53 | F; Xn R: 11-20/21/22-37/38-43-52/53 S: (2-)16-25-37-61 | C ≥ 25 %: Xn; R20/21/22-37/38-43-52-53 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43 | |
| 607-247-00-9 | metacrilato de dodecilo | | 205-570-6 | 142-90-5 | Xi; R36/37/38 N; R50-53 | Xi; N R: 36/37/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 607-249-00-X | diacrilato de (1-metil-1,2- etanodil)bis[oxi(metil-2,1-etanodilo)] | | 256-032-2 | 42978-66-5 | Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53 | Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61 | C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-43-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43 | |
| 608-003-00-4 | acrilonitrilo | D E | 203-466-5 | 107-13-1 | F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53 | F; T; N R: 45-11-23/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-37/38-41-43-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T; R45-23/24/25-37/38-41-43-52/53 10 % ≤ C < 20 %: T; R45-23/24/25-41-43-52/53 5 % ≤ C < 10 %: T; R45-23/24/25-36-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45 | |
| 608-006-00-0 | bromoxinil (ISO) y sus sales 3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo bromoxinil fenol | | 216-882-7 | 1689-84-5 | Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R25 R43 N; R50-53 | T+; N R: 25-26-43-63-50/53 S: (1/2-)27/28-36/37-45-63-60-61 | C ≥ 25 %: T+; N; R25-26-43-63-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R22-26-43-63-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R22-23-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R22-23-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R23-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23-43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|--------------------------------------|-----------------------------------|--|---|--|---|
| 608-007-00-6 | ioxinil (ISO) [1] y sus sales 4-hidroxi-3,5-diiodobenzonitrilo | | 216-881-1 | 1689-83-4 | Repr. Cat. 3; R63 T; R23/25 Xn; R21-48/22 Xi; R36 N; R50-53 | T; N R: 21-23/25-36-48/22- 63-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60- 61-63 | C ≥ 25 %: T, N; R21-23/25-36- 48/22-63-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/22- 36-48/22-63-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R20/22- 48/22-63-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-63- 50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20/22-50- 53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 608-010-00-2 | metacrilonitrilo 2-metil-2-propeno-nitrilo | D | 204-817-5 | 126-98-7 | F; R11 T; R23/24/25 R43 | F; T R: 11-23/24/25-43 S: (1/2-)9-16-18-29-45 | 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-43 C ≥ 1 %: T; R23/24/25-43 | |
| 608-014-00-4 | clorotalonil (ISO) tetracloroisofaltonitrilo | | 217-588-1 | 1897-45-6 | Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R41 Xi; R37 R43 N; R50-53 | T+; N R: 26-37-40-41-43- 50/53 S: (2-)28-36/37/39-45- 60-61 | C ≥ 20 %: T+; N; R26-37-40-41-43- 50-53 10 % ≤ C < 20 %: T+; N; R26-40- 41-43-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R26-40-36- 43-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23-40-36- 43-50-53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R23-40-43- 50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23-40-43- 51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53 | |
| 608-017-00-0 | octanoato de bromoxinilo (ISO) octanoato de 2,6-dibromo-4-cianofenilo | | 216-885-3 | 1689-99-2 | Repr. Cat. 3; R63 T; R23 Xn; R22 R43 N; R50-53 | T; N R: 22-23-43-63-50/53 S: (1/2-)36/37-45-63- 60-61 | 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 C ≥ 25 %: T, N; R22-23-43-63-50- 53 5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-43- 63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20-43-50- 53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 608-018-00-6 | octanoato de 4-ciano-2,6-diiodofenilo octanoato de ioxinilo (ISO) | | 223-375-4 | 3861-47-0 | Repr. Cat. 3; R63 T; R25 Xi; R36 R43 N; R50-53 | T; N R: 25-36-43-63-50/53 S: (1/2-)26-36/37-45- 60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R25-36-43-63-50- 53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-36- 43-63-50-53 5 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R22-43- 63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R22-43-50- 53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 608-021-00-2 | 3-(2-(diaminometilnamino)tiazol-4- ilmetilil)propiononitrilo | | 403-710-2 | 76823-93-3 | Xn; R22 R43 | Xn R: 22-43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 609-007-00-9 | 2,4-dinitrotolueno dinitrotolueno, grado técnico [1] dinitrotolueno [2] | E | 204-450-0 [1] 246-836-1 [2] | 121-14-2 [1] 25321-14-6 [2] | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53 | T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 609-023-00-6 | dinocap (ISO) mezcla de isómeros crotonato de 2,6-dinitro-4-octilfenilo, crotonato de 2,4-dinitro-6-octilfenilo octilfeniloycrotonato de 2,4-dinitro-6- octilfenilo | E | 254-408-0 | 39300-45-3 | Repr. Cat. 2; R61 Xn; R20-48/22 Xi; R38 R43 N; R50-53 | T; N R: 61-20-22-38-43- 48/22-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 609-043-00-5 | quintoceno (ISO) pentacloronitrobenzeno | | 201-435-0 | 82-68-8 | R43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)13-24-37-60-61 | | |
| 609-049-00-8 | 2,6-dinitrotolueno | E | 210-106-0 | 606-20-2 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53 | T R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 609-050-00-3 | 2,3-dinitrotolueno | E | 210-013-5 | 602-01-7 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R50-53 | T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-50/53 S: 53-45-60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|--|---|--|---|
| 609-051-00-9 | 3,4-dinitrotolueno | E | 210-222-1 | 610-39-9 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53 | T; N R: 45-23/24/25-48/22-62-68-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 609-052-00-4 | 3,5-dinitrotolueno | E | 210-566-2 | 618-85-9 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53 | T R: 45-23/24/25-48/22-62-68-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 609-055-00-0 | 2,5-dinitrotolueno | E | 210-581-4 | 619-15-8 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53 | T; N R: 45-23/24/25-48/22-62-68-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 609-056-00-6 | 2,2-dibromo-2-nitroetano | | 412-380-9 | 69094-18-4 | E; R2 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R35 R43 N; R50-53 | E; C; N R: 2-22-35-40-43-48/22-50/53 S: (1/2)-23-26-35-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R22-35-40-43-48/22-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R22-35-40-43-48/22-51/53 5 % ≤ C < 10 %: C, N; R34-40-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R36/37/38-40-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R36/37/38-40-43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | |
| 610-005-00-5 | 1-cloro-4-nitrobenzeno | | 202-809-6 | 100-00-5 | Carc. Cat. 3; R40 Mut. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xn; R48/20/21/22 N; R51-53 | T; N R: 23/24/25-40-48/20/21/22-68-51/53 S: (1/2)-28-36/37-45-61 | | |
| 611-001-00-6 | azobenceno | E | 203-102-5 | 103-33-3 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22-48/22 N; R50-53 | T; N R: 45-20/22-48/22-68-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 611-060-00-8 | Mezcla de: 5-[8-[4-[4-[7-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-1-ilamino]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-2-ilazo]-isofalato de sodio; 5-[8-[4-[4-[7-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-1-ilamino]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-2-ilazo]-isofalato de amonio; ácido 5-[8-[4-[4-[7-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-1-ilamino]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-disulfonatonaftalen-2-ilazo]-isofalato de sodio | | 413-180-4 | - | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)-22-26-39 | | |
| 611-063-00-4 | [4'-(8-acetilamino-3,6-disulfonato-2-naftilazo)-4''-(6-benzoilamino-3-sulfonato-2-naftilazo)-bifenil-1,3',3'',1'''-tetraolato-O,O',O'',O''']cobre(II) de trisodio | | 413-590-3 | 164058-22-4 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 612-008-00-7 | anilina | | 200-539-3 | 62-53-3 | Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25-48/23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50 | T; N R: 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50 S: (1/2)-26-27-36/37/39-45-46-61-63 | C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68 10 % ≤ C < 25 %: T; R20/21/22-40-41-43-48/23/24/25-68 1 % ≤ C < 10 %: T; R20/21/22-40-43-48/23/24/25-68 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20/21/22 | |
| 612-009-00-2 | sales de anilina | A | - | - | Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50 | T; N R: 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50 S: (1/2)-26-27-36/37/39-45-61-63 | C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68 10 % ≤ C < 25 %: T; R20/21/22-40-41-43-48/23/24/25-68 1 % ≤ C < 10 %: T; R20/21/22-40-43-48/23/24/25-68 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20/21/22 | |
| 612-010-00-8 | cloroanilinas (excepto de las especialmente expresadas en este Anexo) | C | - | - | T; R23/24/25 R33 N; R50-53 | T; N R: 23/24/25-33-50/53 S: (1/2)-28-36/37-45-60-61 | | |
| 612-022-00-3 | 2-naftilamina | E | 202-080-4 | 91-59-8 | Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R51-53 | T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-22-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %: T; R45 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--|---|---|--|--|---|
| 612-023-00-9 | fenilhidracina [1] cloruro de fenilhidracina [2] hidrocloruro de fenilhidracina [3] sulfato de fenilhidracina (1:2) [4] | E | 202-873-5 [1] 200-444-7 [2] 248-259-0 [3] 257-622-2 [4] | 100-63-0 [1] 59-88-1 [2] 27140-08-5 [3] 52033-74-6 [4] | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25- 48/23/24/25 Xi; R36/38 R43 N; R50 | T; N R: 45-23/24/25-36/38- 43-48/23/24/25-68-50 S: 53-45-61 | | |
| 612-025-00-X | nitrotoluidina (excepto de las especialmente expresadas en este Anexo) | C | - | - | T; R23/24/25 R33 N; R51-53 | T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45- 61 | | |
| 612-035-00-4 | 2-metoxianilina <i>o</i> -anisidina | E | 201-963-1 | 90-04-0 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 | T R: 45-23/24/25-68 S: 53-45 | | |
| 612-042-00-2 | bencidina 1,1'-bifenil-4,4'-diamina 4,4'-diaminobifenilo | E | 202-199-1 | 92-87-5 | Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53 | T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R45-22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-51/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %: T; R45 | |
| 612-051-00-1 | 4,4'-diaminodifenilmetano 4,4'-metilendianilina | E | 202-974-4 | 101-77-9 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53 | T; N R: 45-39/23/24/25-43- 48/20/21/22-68-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 612-054-00-8 | <i>N,N</i> -dietilnilina | | 202-088-8 | 91-66-7 | T; R23/24/25 R33 N; R51-53 | T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-37-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-33- 51/53 5 % ≤ C < 25 %: T; R23/24/25-33- 52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn; R20/21/22- 33-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-33 | |
| 612-056-00-9 | <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -toluidina [1] <i>N,N</i> -dimetil- <i>m</i> -toluidina [2] <i>N,N</i> -dimetil- <i>o</i> -toluidina [3] | C | 202-805-4 [1] 204-495-6 [2] 210-199-8 [3] | 99-97-8 [1] 121-72-2 [2] 609-72-3 [3] | T; R23/24/25 R33 R52-53 | T R: 23/24/25-33-52/53 S: (1/2-)28-36/37-45- 61 | C ≥ 25 %: T; R23/24/25-33-52-53 5 % ≤ C < 25 %: T; R23/24/25-33 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R20/21/22-33 | |
| 612-059-00-5 | 3,6-diazaoctano-1,8-diamina trietilentetramina 1,8-diamino-3,6-diaza-octano | | 203-950-6 | 112-24-3 | Xn; R21 C; R34 R43 R52-53 | C R: 21-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39- 45-61 | C ≥ 25 %: C; R21-34-43-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43 | |
| 612-060-00-0 | 3,6,9-triazaundecano-1,11-diamina tetraetilenpentamina 1,11-diamino-3,6,9-triaza-undecano | | 203-986-2 | 112-57-2 | Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R51-53 | C; N R: 21/22-34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39- 45-61 | C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43- 51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43-52/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43- 52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43 | |
| 612-064-00-2 | 3,6,9,12-tetraazatetradecano-1,14-diamina pentaetilenhexamina 1,14-diamino-3,6,9,12-tetra aza- tetradecano | | 223-775-9 | 4067-16-7 | C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39- 45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43- 51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43- 51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | |
| 612-065-00-8 | polietilenpoliaminas excepto aquellas específicamente expresadas en este Anexo | | - | - | Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39- 45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43- 50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43- 51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43- 51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | |
| 612-066-00-3 | diciclohexilamina | | 202-980-7 | 101-83-7 | Xn; R22 C; R34 N; R50-53 | C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39- 45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38- 51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/38-52/53 0,25 % ≤ C < 2 %: R52/53 | |
| 612-067-00-9 | 3-aminometil-3,5,5-trimetilciclohexilamina | | 220-666-8 | 2855-13-2 | Xn; R21/22 C; R34 R43 R52-53 | C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39- 45-61 | C ≥ 25 %: C; R21/22-34-43-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|---|---|--|--|--|---|
| 612-077-00-3 | dimetilnitrosoamina N-nitrosodimetilamina | E | 200-549-8 | 62-75-9 | Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R25-48/25 N; R51-53 | T+; N R: 45-25-26-48/25-51/53 S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-25-26-48/25-51/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-48/25-52/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-22-26-48/22-52/53 3 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-48/22-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; R45-23-48/22-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23-48/22 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,001 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 612-086-00-2 | amitraz (ISO) N,N-bis(2,4-xililiminometil) metilamina | | 251-375-4 | 33089-61-1 | Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)22-60-24-61-36/37 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-48/22-50-53 10 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R43-48/22-50-53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53 | |
| 612-087-00-8 | guazatina | | 236-855-3 | 13516-27-3 | T+; R26 Xn; R21/22 Xi; R37/38-41 N; R50-53 | T+; N R: 21/22-26-37/38-41-50/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-38-45-46-60-61-63 | | |
| 612-094-00-6 | 4-(2-cloro-4-trifluorometil)fenoxi-2-fluoroanilina, clorhidrato | | 402-190-4 | - | T; R48/25 Xn; R22-48/20 Xi; R41 R43 N; R50-53 | T; N R: 22-41-43-48/20-48/25-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 612-121-00-1 | aminas, polietilenpoli- HEPA | | 268-626-9 | 68131-73-7 | Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53 | |
| 612-136-00-3 | N-isopropil-N'-fenil-p-fenilendiamina | | 202-969-7 | 101-72-4 | Xn; R22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R43 | |
| 612-151-00-5 | diaminotolueno, producto técnico-mezcla de [2] y [3] metilfenilendiamina [1] 4-metil-m-fenilendiamina [2] 2-metil-m-fenilendiamina [3] | E | 246-910-3 [1] 202-453-1 [2] 212-513-9 [3] | 25376-45-8 [1] 95-80-7 [2] 823-40-5 [3] | Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53 | T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 613-009-00-5 | 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina cloruro cianurico | | 203-614-9 | 108-77-0 | T+; R26 Xn; R22 C; R34 R43 R14 | T+; C R: 14-22-26-34-43 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-46-63 | C ≥ 25 %: T+; R22-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %: T+; R26-34-43 7 % ≤ C < 10 %: T+; R26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %: T; R23-36/37/38-43 1 % ≤ C < 5 %: T; R23-43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20 | |
| 613-011-00-6 | amitrol (ISO) 1,2,4-triazol-3-ilamina | | 200-521-5 | 61-82-5 | Repr.Cat.3; R63 Xn; R48/22 N; R51-53 | Xn; N R: 48/22-63-51/53 S: (2-)13-36/37-61 | | |
| 613-030-00-X | trocloseno potásico [1] trocloseno sódico [2] | | 218-828-8 [1] 220-767-7 [2] | 2244-21-5 [1] 2893-78-9 [2] | O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53 | O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-)8-26-41-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-31-36/37-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-31-36/37-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R; 52/53 | |
| 613-033-00-6 | 2-metilaziridina propilnimina | E | 200-878-7 | 75-55-8 | F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T+; R26/27/28 Xi; R41 N; R51-53 | F; T+; N R: 45-11-26/27/28-41-51/53 S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T+, N; R45-26/27/28-41-51/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-26/27/28-41-52/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-26/27/28-36-52/53 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-23/24/25-36-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45 | |
| 613-040-00-4 | azaconazol (ISO) 1-[[2-(2,4-diclorofenil)-1,3-dioxolan-2-il]metil]-1H-1,2,4-triazol | | 262-102-3 | 60207-31-0 | Xn; R22 | Xn R: 22 S: (2-)46 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--------------------------------------|--|--|---|---|---|
| 613-043-00-0 | sulfato de imazalil (ISO) polvo hidrogenosulfato de 1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)-1H-imidazolío [1] hidrogenosulfato de (±)-1- [2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)]-1H-imidazolío [2] | | 261-351-5 [1] 281-291-3 [2] | 58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2] | Xn; R22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24/25-37-46-60-61 | | |
| 613-048-00-8 | carbendazim o carbendazima (ISO) bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo metil 2 benzimidazol carbamato | | 234-232-0 | 10605-21-7 | Muta. Cat. 2; R46 Repr.Cat.2; R60-61 N; R50-53 | T; N R: 46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 613-049-00-3 | benomilo (ISO) 1-(butilcarbamoil)bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo | | 241-775-7 | 17804-35-2 | Muta. Cat. 2; R46 Repr.Cat.2; R60-61 Xi; R37/38 R43 N; R50-53 | T; N R: 46-60-61-37/38-43-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 20 %: T, N; R46-60-61-37/38-43-50-53 2,5 % ≤ C < 20 %: T, N; R46-60-61-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R46-60-61-43-51-53 0,5 % ≤ C < 1 %: T, N; R46-60-61-51-53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T, N; R46-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R46-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53 | |
| 613-051-00-4 | molinato (ISO) perhidroazepina-1-carbotioato de S-etilo | | 218-661-0 | 2212-67-1 | Carc.Cat3; R40 Repr.Cat3; R62 Xn; R20/22 Xn; R48/22 R43 N; R50-53 | T; N R: 20/22-40-43-48/22-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-40-43-48/22-62-50-53 10 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R40-43-48/22-62-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R40-43-62-50-53 1 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R40-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 613-058-00-2 | 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de <i>m</i> -fenoxibencilo permetrina (ISO) | | 258-067-9 | 52645-53-1 | Xn; R20/22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 20/22-43-50/53 S: (2-)13-24-36/37/39-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %: N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53 | |
| 613-075-00-5 | 1,3-dicloro-5-etil-5-metilimidazolidina-2,4-diona | | 401-570-7 | 89415-87-2 | O; R8 T; R23 C; R34 Xn; R22 R43 N; R50 | O; T; N R: 8-22-23-34-43-50 S: (1/2)-8-26-36/37/39-45-61 | | |
| 613-088-00-6 | 1,2-bencisotiazol-3(2H)-ona 1,2-bencisotiazol-3-ona | | 220-120-9 | 2634-33-5 | Xn; R22 Xi; R38-41 R43 N; R50 | Xn; N R: 22-38-41-43-50 S: (2-)24-26-37/39-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-38-41-43-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R38-41-43 10 % ≤ C < 20 %: Xi; R41-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36-43 0,05 % ≤ C < 5 %: Xi; R43 | |
| 613-112-00-5 | 2-octil-2H-isotiazol-3-ona | | 247-761-7 | 26530-20-1 | T; R23/24 Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53 | T; N R: 22-23/24-34-43-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R22-23/24-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R20/21-34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/21-36/38-43-51/53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20/21-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,05 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R43 | |
| 613-124-00-0 | fenpropimorf <i>cis</i> /ot/-4-[3-(<i>p</i> -terc.it.-butilfenil)-2-metilpropil]-2,6-dimetilmorfolina | | 266-719-9 | 67564-91-4 | Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53 | Xn; N R: 22-38-63-51/53 S: (2-)36/37-46-61 | | |
| 613-129-00-8 | metamitron 4-amino-3-metil-6-fenil-1,2,4-triazin-5-ona | | 255-349-3 | 41394-05-2 | Xn; R22 N; R50 | Xn; N R: 22-50 S: (2-)61 | | |
| 613-167-00-5 | mezcla de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no. 220-239-6] (3:1) mezcla de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [EC no. 247-500-7] y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [EC no. 220-239-6] (3:1) | | - | 55965-84-9 | T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53 | T; N R: 23/24/25-34-43-50/53 S: (2-)26-28-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-34-43-50/53 3 % ≤ C < 25 %: C, N; R20/21/22-34-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: C, N; R34-43-51/53 0,6 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R34-43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,6 %: Xi; R33/38-43-52/53 0,06 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R36/38-43 0,0015 % ≤ C < 0,06 %: Xi; R43 | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|--|--|--|---|--|---|
| 613-175-00-9 | epoxiconazol (2 <i>RS</i> ,3 <i>SR</i>)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluorofenil)-[1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il]metil]oxirano | | 406-850-2 | 133855-98-8 | Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R62 Repr. Cat. 3; R63 N; R51-53 | Xn; N R: 40-62-63-51/53 S: (2-)36/37-46-61 | | |
| 615-001-00-7 | isocianato de metilo | | 210-866-3 | 624-83-9 | F+; R12 Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R24/25 R42/43 Xi; R37/38-41 | F+; T+ R: 12-24/25-26-37/38-41-42/43-63 S: (1/2-)26-27/28-36/37/39-45-63 | | |
| 615-004-00-3 | compuestos orgánicos con ácido tiocianico | A | - | - | Xn; R20/21/22 R32 R52-53 | Xn R: 20/21/22-32-52/53 S: (2-)13-61 | | |
| 615-006-00-4 | diisocianato de 2-metil- <i>m</i> -fenileno 2,4-diisocianato de tolueno [1] diisocianato de 4-metil- <i>m</i> -fenileno 2,6-diisocianato de tolueno [2] diisocianato de <i>m</i> -tolilideno diisocianato de tolueno [3] | | 202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3] | 91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3] | Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53 | T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61 | C ≥ 25 %: T+; R26-36/37/38-40-42/43-52/53 20 % ≤ C < 25 %: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26-40-42/43 1 % ≤ C < 7 %: T; R23-40-42/43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20-42 | |
| 615-008-00-5 | isocianato de 3-isocianatometil-3,5,5-trimetilciclohexilo diisocianato de isoformona | | 223-861-6 | 4098-71-9 | T; R23 Xi; R36/37/38 R42/43 N; R51-53 | T; N R: 23-36/37/38-42/43-51/53 S: (1/2-)26-28-38-45-61 | C ≥ 25 %: T, N; R23-36/37/38-42/43-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T; R23-36/37/38-42/43-52/53 2,5 % ≤ C < 20 %: T; R23-42/43-52/53 2 % ≤ C < 2,5 %: T; R23-42/43 0,5 % ≤ C < 2 %: Xn; R20-42/43 | 2 |
| 615-015-00-3 | tiocianatoacetato de 1,7,7-trimetilbicyclo(2,2,1)hept-2-ilo tiocianatoacetato de isobornilo | | 204-081-5 | 115-31-1 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24/25-60-61 | | |
| 616-015-00-6 | alaclo (ISO) 2-cloro-2',6'-dietil- <i>N</i> -(metoximetil)acetanilida | | 240-110-8 | 15972-60-8 | Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-40-43-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | C ≥ 25 %: Xn, N; R22-40-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R40-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53 | |
| 616-024-00-5 | 2-(4,4-dimetil-2,5-dioxooxazolidin-1-il)-2-cloro-5-(2-(2,4-di-terc-pentilfenoxi)butiramido)-4,4-dimetil-3-oxovaleránida | | 402-260-4 | - | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 617-002-00-8 | hidroperóxido de α,α -dimetilbencilo hidroperóxido de cumeno | | 201-254-7 | 80-15-9 | O; R7 T; R23 Xn; R21/22-48/20/22 S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45-50-61 C; R34 N; R51-53 | O; T; N R: 7-21/22-23-34-48/20/22-51/53 S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45-50-61 | C ≥ 25 %: T, N; R21/22-23-34-48/20/22-51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-34-48/20/22-52/53 3 % ≤ C < 10 %: Xn; R20-37/38-41-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/37 | |
| 617-004-00-9 | hidroperóxido de 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo | | 212-230-0 | 771-29-9 | O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53 | O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53 | |
| 648-043-00-X | aceite de creosota, fracción de acenafteno, libre de acenafteno redistilado aceite lavaje | H | 292-606-9 | 90640-85-0 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-045-00-0 | destilados (alquitrán de hulla), superiores aceite de antraceno fracción pesada | H | 266-026-1 | 65996-91-0 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-079-00-6 | aceite de antraceno | H | 292-602-7 | 90640-80-5 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-080-00-1 | residuos (alquitrán de hulla), destilación del aceite de creosota Redistilado aceite lavaje | H | 295-506-3 | 92061-93-3 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-085-00-9 | destilados (alquitrán de hulla), aceites de naftaleno aceites de naftaleno | H | 283-484-8 | 84650-04-4 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-098-00-X | aceite de creosota, fracción de acenafteno Aceite de lavaje | H | 292-605-3 | 90640-84-9 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-099-00-5 | aceite de creosota | H | 263-047-8 | 61789-28-4 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-100-00-9 | aceite de creosota, destilado de elevado punto de ebullición Aceite de lavaje | H | 274-565-9 | 70321-79-8 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|--|---------------------------|--------------------------|---|
| 648-101-00-4 | creosota | H | 232-287-5 | 8001-58-9 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-102-00-X | residuos del extracto (hulla), ácido de aceite de creosota residuo del extracto del aceite lavaje | H | 310-189-4 | 122384-77-4 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-110-00-3 | residuos del extracto (hulla), alcalino de alquitrán de hulla a baja temperatura | H | 310-191-5 | 122384-78-5 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 648-138-00-6 | aceite de creosota, destilado de bajo punto de ebullición Aceite de lavaje | H | 274-566-4 | 70321-80-1 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-001-00-3 | extractos (petróleo), destilado nafténico ligero extraído con disolventes | H | 265-102-1 | 64742-03-6 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-002-00-9 | extractos (petróleo), destilado parafínico pesado extraído con disolvente | H | 265-103-7 | 64742-04-7 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-003-00-4 | extractos (petróleo), destilado parafínico ligero extraído con disolvente | H | 265-104-2 | 64742-05-8 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-004-00-X | extractos (petróleo), destilado nafténico pesado extraído con disolvente | H | 265-111-0 | 64742-11-6 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-005-00-5 | extractos (petróleo), disolvente de gasóleo ligero obtenido a vacío | H | 295-341-7 | 91995-78-7 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-006-00-0 | hidrocarburos, C ₂₆₋₅₅ , ricos en aromáticos | H | 307-753-7 | 97722-04-8 | Carc. Cat. 2; R45 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-062-00-6 | gases (petróleo), producto de cabeza del despropanizador de nafta craqueada catalíticamente Gases de petróleo | H K | 270-755-0 | 68477-73-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-063-00-1 | gases (petróleo), craqueador catalítico Gases de petróleo | H K | 270-756-6 | 68477-74-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-064-00-7 | gases (petróleo), craqueador catalítico, ricos en C ₁₋₅ Gases de petróleo | H K | 270-757-1 | 68477-75-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-065-00-2 | gases (petróleo), productos de cabeza del estabilizador de nafta polimerizada catalíticamente, ricos en C ₂₋₄ Gases de petróleo | H K | 270-758-7 | 68477-76-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-066-00-8 | gases (petróleo), reformador catalítico, ricos en C ₁₋₄ Gases de petróleo | H K | 270-760-8 | 68477-79-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-067-00-3 | gases (petróleo), alimentación de C ₃₋₅ para la alquilación parafínica-olefínica Gases de petróleo | H K | 270-765-5 | 68477-83-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-068-00-9 | gases (petróleo), ricos en C ₄ Gases de petróleo | H K | 270-767-6 | 68477-85-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-069-00-4 | gases (petróleo), productos de cabeza del desetanizador Gases de petróleo | H K | 270-768-1 | 68477-86-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-070-00-X | gases (petróleo), productos de cabeza de la torre del desisobutanizador Gases de petróleo | H K | 270-769-7 | 68477-87-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-071-00-5 | gases (petróleo), despropanizador por vía seca, ricos en propeno Gases en petróleo | H K | 270-772-3 | 68477-90-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-072-00-0 | gases (petróleo), productos de cabeza del despropanizador Gases de petróleo | H K | 270-773-9 | 68477-91-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-073-00-6 | gases (petróleo), productos de cabeza del despropanizador de la planta de recuperación de gas Gases de petróleo | H K | 270-777-0 | 68477-94-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-074-00-1 | gases (petróleo), alimentación de la unidad Girbotol Gases de petróleo | H K | 270-778-6 | 68477-95-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-075-00-7 | gases (petróleo), fraccionador de nafta isomerizada, ricos en C ₄ , libres de sulfuro de hidrógeno Gases de petróleo | H K | 270-782-8 | 68477-99-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-076-00-2 | gas de cola (petróleo), aceite clarificado craqueado catalíticamente y tambor de reflujo para el fraccionamiento del residuo obtenido a vacío craqueado térmicamente Gases de petróleo | H K | 270-802-5 | 68478-21-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|------------|--|---------------------------|--------------------------|---|
| 649-077-00-8 | gases de cola (petróleo), aparato de absorción para la estabilización de nafta craqueada catalíticamente Gases de petróleo | H K | 270-803-0 | 68478-22-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-078-00-3 | gas de cola (petróleo), fraccionador para los productos combinados del hidrosulfurizador, reformador catalítico y craqueador catalítico Gases de petróleo | H K | 270-804-6 | 68478-24-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-079-00-9 | gas de cola (petróleo), estabilizador para el fraccionamiento de nafta reformada catalíticamente Gases de petróleo | H K | 270-806-7 | 68478-26-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-080-00-4 | gas de cola (petróleo), corriente mixta del saturado de la planta de gas, rico en C ₄ Gases de petróleo | H K | 270-813-5 | 68478-32-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-081-00-X | gas de cola (petróleo), saturado de la planta de recuperación de gas, rico en C _{1,2} Gases de petróleo | H K | 270-814-0 | 68478-33-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-082-00-5 | gas de cola (petróleo), craqueador térmico de residuos obtenidos a vacío Gases de petróleo | H K | 270-815-6 | 68478-34-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-083-00-0 | hidrocarburos, ricos en C ₃₋₄ , destilado del petróleo Gases de petróleo | H K | 270-990-9 | 68512-91-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-084-00-6 | gases (petróleo), deshexanizador de la serie completa de nafta de primera destilación Gases de petróleo | H K | 271-000-8 | 68513-15-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-085-00-1 | gases (petróleo), despropanizador de hidrocrqueo, ricos en hidrocarburos Gases de petróleo | H K | 271-001-3 | 68513-16-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-086-00-7 | gases (petróleo), estabilizador de nafta ligera de primera destilación Gases de petróleo | H K | 271-002-9 | 68513-17-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-087-00-2 | residuos (petróleo), separador de alquilación ricos en C ₄ Gases de petróleo | H K | 271-010-2 | 68513-66-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-088-00-8 | hidrocarburos, C ₁₋₄ Gases de petróleo | H K | 271-032-2 | 68514-31-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-089-00-3 | hidrocarburos, C ₁₋₄ , desazufrados Gases de petróleo | H K | 271-038-5 | 68514-36-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-090-00-9 | hidrocarburos, C _{1,3} Gases de petróleo | H K | 271-259-7 | 68527-16-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-091-00-4 | hidrocarburos, C ₁₋₄ , fracción del desbutanizador Gases de petróleo | H K | 271-261-8 | 68527-19-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-092-00-X | gases (petróleo), C _{1,5} , en húmedo Gases de petróleo | H K | 271-624-0 | 68602-83-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-093-00-5 | hidrocarburos, C _{2,4} Gases de petróleo | H K | 271-734-9 | 68606-25-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-094-00-0 | hidrocarburos, C ₃ Gases de petróleo | H K | 271-735-4 | 68606-26-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-095-00-6 | gases (petróleo), alimentación por alquilación Gases de petróleo | H K | 271-737-5 | 68606-27-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-096-00-1 | gases (petróleo), fraccionamiento de los residuos del fondo del despropanizador Gases de petróleo | H K | 271-742-2 | 68606-34-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-097-00-7 | gases (petróleo), mezcla de refinería Gases de petróleo | H K | 272-183-7 | 68783-07-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-098-00-2 | gases (petróleo), craqueo catalítico Gases de petróleo | H K | 272-203-4 | 68783-64-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-099-00-8 | gases (petróleo), C ₂₋₄ , desazufrados Gases de petróleo | H K | 272-205-5 | 68783-65-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-100-00-1 | gases (petróleo), fraccionamiento de petróleo crudo Gases de petróleo | H K | 272-871-7 | 68918-99-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-101-00-7 | gases (petróleo), deshexanizador Gases de petróleo | H K | 272-872-2 | 68919-00-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|------------|---|----------------------------------|--------------------------|---|
| 649-102-00-2 | gases (petróleo), estabilizador para el fraccionamiento de gasolina ligera de primera destilación Gases de petróleo | H K | 272-878-5 | 68919-05-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-103-00-8 | gases (petróleo), extractor para la desulfuración de nafta en la unidad de refino Gases de petróleo | H K | 272-879-0 | 68919-06-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-104-00-3 | gases (petróleo), reformado catalítico de nafta de primera destilación Gases de petróleo | H K | 272-882-7 | 68919-09-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-105-00-9 | gases (petróleo), productos de cabeza del separador para el craqueador catalítico fluidizado Gases de petróleo | H K | 272-893-7 | 68919-20-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-106-00-4 | gases (petróleo), estabilizador de fracciones de primera destilación Gases de petróleo | H K | 272-883-2 | 68919-10-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45 S: 53-45 | | |
| 649-107-00-X | gases (petróleo), desbutanizador de nafta craqueada catalíticamente Gases de petróleo | H K | 273-169-3 | 68952-76-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-108-00-5 | gas de cola (petróleo), estabilizador de nafta y destilado craqueados catalíticamente Gases de petróleo | H K | 273-170-9 | 68952-77-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-109-00-0 | gas de cola (petróleo), aparato de absorción de nafta, gasóleo y destilado craqueados catalíticamente Gases de petróleo | H K | 273-175-6 | 68952-81-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-110-00-6 | gas de cola (petróleo), estabilizador para el fraccionamiento de hidrocarburos craqueados térmicamente, coquización de petróleo Gases de petróleo | H K | 273-176-1 | 68952-82-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-111-00-1 | gases (petróleo), fracción ligera craqueada a vapor, concentrado de butadieno Gases de petróleo | H K | 273-265-5 | 68955-28-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-112-00-7 | gases (petróleo), productos de cabeza del estabilizador del reformador catalítico de nafta de primera destilación Gases de petróleo | H K | 273-270-2 | 68955-34-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-113-00-2 | hidrocarburos, C ₄ - Gases de petróleo | H K | 289-339-5 | 87741-01-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-114-00-8 | alcanos, C ₁₋₄ , ricos en C ₃ Gases de petróleo | H K | 292-456-4 | 90622-55-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-115-00-3 | gases (petróleo), fracción rica en C ₃ del craqueador a vapor Gases de petróleo | H K | 295-404-9 | 92045-22-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-116-00-9 | hidrocarburos, C ₄ , destilado del craqueador a vapor Gases de petróleo | H K | 295-405-4 | 92045-23-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-117-00-4 | gases del petróleo, licuados, desazufrados, fracción de C ₄ gases de petróleo | HKS | 295-463-0 | 92045-80-2 | F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | F+; T R: 12-45-46 S: 53-45 | | |
| 649-119-00-5 | refinados (petróleo), extracción de acetato de amonio cuproso de la fracción de C ₄ craqueada a vapor C _{3,5} e insaturados de C _{3,5} libres de butadieno Gases de petróleo | H K | 307-769-4 | 97722-19-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-120-00-0 | gases (petróleo), alimentación del sistema con aminas Gas de refinería | H K | 270-746-1 | 68477-65-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-121-00-6 | gases (petróleo), hidrosulfurador de la unidad de benceno Gas de refinería | H K | 270-747-7 | 68477-66-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-122-00-1 | gases (petróleo), reciclado de la unidad de benceno, ricos en hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-748-2 | 68477-67-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-123-00-7 | gases (petróleo), aceite de mezcla, ricos en hidrógeno y nitrógeno Gas de refinería | H K | 270-749-8 | 68477-68-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|------------|--|---------------------------|--------------------------|---|
| 649-124-00-2 | gases (petróleo), productos de cabeza del extractor de nafta reformada catalíticamente Gas de refinería | H K | 270-759-2 | 68477-77-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-125-00-8 | Gases (petróleo), reciclado de C ₆₋₈ en el reformador catalítico Gas de refinería | H K | 270-761-3 | 68477-80-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-126-00-3 | gases (petróleo), reformador catalítico de C ₆₋₈ Gas de refinería | H K | 270-762-9 | 68477-81-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-127-00-9 | gases (petróleo), reciclado de C ₆₋₈ del reformador catalítico, ricos en hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-763-4 | 68477-82-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-128-00-4 | gases (petróleo), corriente de reflujo de C ₂ Gas de refinería | H K | 270-766-0 | 68477-84-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-129-00-X | gases (petróleo), secos y con azufre, unidad de concentración de gas Gas de refinería | H K | 270-774-4 | 68477-92-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-130-00-5 | gases (petróleo), destilación en el reabsorbedor de concentración de gas Gas de refinería | H K | 270-776-5 | 68477-93-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-131-00-0 | gases (petróleo), aparato de absorción de hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-779-1 | 68477-96-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-132-00-6 | gases (petróleo), ricos en hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-780-7 | 68477-97-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-133-00-1 | gases (petróleo), reciclado del aceite de mezcla en el aparato para el tratamiento con hidrógeno, ricos en hidrógeno y nitrógeno Gas de refinería | H K | 270-781-2 | 68477-98-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-134-00-7 | gases (petróleo), reciclado, ricos en hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-783-3 | 68478-00-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-135-00-2 | gases (petróleo), composición del reformador, ricos en hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-784-9 | 68478-01-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-136-00-8 | gases (petróleo), reformado en el aparato para el tratamiento con hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-785-4 | 68478-02-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-137-00-3 | gases (petróleo), reformado en el aparato para el tratamiento con hidrógeno, ricos en hidrógeno y metano Gas de refinería | H K | 270-787-5 | 68478-03-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-138-00-9 | gases (petróleo), composición del reformado en el aparato para el tratamiento con hidrógeno, ricos en hidrógeno Gas de refinería | H K | 270-788-0 | 68478-04-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-139-00-4 | gases (petróleo), destilación de los productos de craqueo térmico Gas de refinería | H K | 270-789-6 | 68478-05-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-140-00-X | gas de cola (petróleo), aparato de absorción para el refraccionamiento de productos del craqueador catalítico Gas de refinería | H K | 270-805-1 | 68478-25-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-141-00-5 | gas de cola (petróleo), separador de nafta reformada catalíticamente Gas de refinería | H K | 270-807-2 | 68478-27-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-142-00-0 | gas de cola (petróleo), estabilizador de nafta reformada catalíticamente Gas de refinería | H K | 270-808-8 | 68478-28-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-143-00-6 | gas de cola (petróleo), separador del aparato para el tratamiento con hidrógeno del destilado craqueado Gas de refinería | H K | 270-809-3 | 68478-29-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-144-00-1 | gas de cola (petróleo), separador de nafta de primera destilación hidrodesulfurada Gas de refinería | H K | 270-810-9 | 68478-30-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-145-00-7 | gases (petróleo), productos de cabeza del estabilizador de nafta de primera destilación reformada catalíticamente Gas de refinería | H K | 270-999-8 | 68513-14-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|--|---------------------------|--------------------------|---|
| 649-146-00-2 | gases (petróleo), efluente del reformador con tambor de expansión súbita a alta presión Gas de refinería | H K | 271-003-4 | 68513-18-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-147-00-8 | gases (petróleo), efluente del reformador con tambor de expansión súbita a baja presión Gas de refinería | H K | 271-005-5 | 68513-19-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-148-00-3 | gases (petróleo), destilación de gas de refinería de petróleo Gas de refinería | H K | 271-258-1 | 68527-15-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-149-00-9 | gases (petróleo), productos de cabeza del despentanizador del aparato para tratamiento con hidrógeno de la unidad de benceno Gas de refinería | H K | 271-623-5 | 68602-82-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-150-00-4 | gases (petróleo), aparato de absorción secundario, fraccionador de los productos de cabeza del craqueador catalítico fluidizado Gas de refinería | H K | 271-625-6 | 68602-84-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-151-00-X | productos del petróleo, gases de refinería Gas de refinería | H K | 271-750-6 | 68607-11-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-152-00-5 | gases (petróleo), separador a baja presión de hidrocrackeo Gas de refinería | H K | 272-182-1 | 68783-06-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-153-00-0 | gases (petróleo), refinería Gas de refinería | H K | 272-338-9 | 68814-67-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-154-00-6 | gases (petróleo), separador de productos del reformador al platino Gas de refinería | H K | 272-343-6 | 68814-90-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-155-00-1 | gases (petróleo), estabilizador para el despentanizador de querosina con azufre tratada con hidrógeno Gas de refinería | H K | 272-775-5 | 68911-58-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-156-00-7 | gases (petróleo), tambor de expansión súbita para querosina con azufre tratada con hidrógeno Gas de refinería | H K | 272-776-0 | 68911-59-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-157-00-2 | gases (petróleo), extractor para la desulfuración del destilado en la unidad de refino Gas de refinería | H K | 272-873-8 | 68919-01-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-158-00-8 | gases (petróleo), fraccionamiento en el craqueador catalítico fluidizado Gas de refinería | H K | 272-874-3 | 68919-02-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-159-00-3 | gases (petróleo), aparato de absorción auxiliar para la depuración en el craqueador catalítico fluidizado Gas de refinería | H K | 272-875-9 | 68919-03-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-160-00-9 | gases (petróleo), extractor para la desulfuración del destilado pesado en el aparato para el tratamiento con hidrógeno Gas de refinería | H K | 272-876-4 | 68919-04-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-161-00-4 | gases (petróleo), estabilizador del reformador al platino, fraccionamiento de los productos finales ligeros Gas de refinería(Combinación compleja obtenida por el fraccionamiento de los productos finales ligeros de los reactores de platino de la unidad del reformador al platino. Compuesta de hidrógeno, metano, etano y propano.) | H K | 272-880-6 | 68919-07-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-162-00-X | gases (petróleo), torre de predestilación, destilación del petróleo crudo Gas de refinería | H K | 272-881-1 | 68919-08-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-163-00-5 | gases (petróleo), extractor de alquitrán Gas de refinería | H K | 272-884-8 | 68919-11-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-164-00-0 | gases (petróleo), extractor de la unidad de refino Gas de refinería | H K | 272-885-3 | 68919-12-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-165-00-6 | gas de cola (petróleo), separador de nafta hidrodesulfurada catalíticamente Gas de refinería | H K | 273-173-5 | 68952-79-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|------------|--|---------------------------|--------------------------|---|
| 649-166-00-1 | gas de cola (petróleo), hidrodesulfurador de nafta de primera destilación Gas de refinería | H K | 273-174-0 | 68952-80-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-167-00-7 | gases (petróleo), fraccionamiento del producto de cabeza del aparato de absorción con esponja, craqueador catalítico fluidizado y desulfurizador de gasóleo Gas de refinería | H K | 273-269-7 | 68955-33-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-168-00-2 | gases (petróleo), destilación de petróleo crudo y craqueo catalítico Gas de refinería | H K | 273-563-5 | 68989-88-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-169-00-8 | gases (petróleo), depurador de gasóleos con dietanolamina Gas de refinería | H K | 295-397-2 | 92045-15-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-170-00-3 | gases (petróleo), efluente de la hidrodesulfuración del gasóleo Gas de refinería | H K | 295-398-8 | 92045-16-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-171-00-9 | gases (petróleo), purga de la hidrodesulfuración de gasóleo Gas de refinería | H K | 295-399-3 | 92045-17-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-172-00-4 | gases (petróleo), tambor de expansión súbita del efluente del hidrogenador Gas de refinería | H K | 295-400-7 | 92045-18-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-173-00-X | gases (petróleo), fracción residual a alta presión del craqueo a vapor de nafta Gas de refinería | H K | 295-401-2 | 92045-19-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-174-00-5 | gases (petróleo), reducción de viscosidad del residuo Gas de refinería | H K | 295-402-8 | 92045-20-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-177-00-1 | gases (petróleo), C ₃₋₄ Gases de petróleo | H K | 268-629-5 | 68131-75-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-178-00-7 | gas de cola (petróleo), aparato de absorción para el fraccionamiento de nafta craqueada catalíticamente y del destilado craqueado catalíticamente Gases de petróleo | H K | 269-617-2 | 68307-98-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-179-00-2 | gas de cola (petróleo), estabilizador para el fraccionamiento de nafta de polimerización catalítica Gases de petróleo | H K | 269-618-8 | 68307-99-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-180-00-8 | gas de cola (petróleo), estabilizador para el fraccionamiento de nafta reformada catalíticamente, libre de sulfuro de hidrógeno Gases de petróleo | H K | 269-619-3 | 68308-00-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-181-00-3 | gas de cola (petróleo), extractor del aparato para el tratamiento con hidrógeno del destilado craqueado Gases de petróleo | H K | 269-620-9 | 68308-01-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-182-00-9 | gas de cola (petróleo), hidrodesulfurador para el destilado de primera destilación, libre de sulfuro de hidrógeno Gases de petróleo | H K | 269-630-3 | 68308-10-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-183-00-4 | gas de cola (petróleo), aparato de absorción para el craqueo catalítico de gasóleo Gases de petróleo | H K | 269-623-5 | 68308-03-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-184-00-X | gas de cola (petróleo), planta de recuperación de gas Gases de petróleo | H K | 269-624-0 | 68308-04-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-185-00-5 | gas de cola (petróleo), desetanizador de la planta de recuperación de gas Gases de petróleo | H K | 269-625-6 | 68308-05-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-186-00-0 | gas de cola (petróleo), fraccionador para nafta hidrodesulfurada y destilado hidrodesulfurado, libre de ácido Gases de petróleo | H K | 269-626-1 | 68308-06-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-187-00-6 | gas de cola (petróleo), extractor para gasóleo obtenido a vacío e hidrodesulfurado, libre de sulfuro de hidrógeno Gases de petróleo | H K | 269-627-7 | 68308-07-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|------------|---|----------------------------------|--------------------------|---|
| 649-188-00-1 | gas de cola (petróleo), estabilizador de nafta ligera de primera destilación, libre de sulfuro de hidrógeno Gases de petróleo | H K | 269-629-8 | 68308-09-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-189-00-7 | gas de cola (petróleo), desetanizador para la preparación de la alimentación para la alquilación de propano-propileno Gases de petróleo | H K | 269-631-9 | 68308-11-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-190-00-2 | gas de cola (petróleo), hidrodesulfurador para gasóleo obtenido a vacío, libre de sulfuro de hidrógeno Gases de petróleo | H K | 269-632-4 | 68308-12-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-191-00-8 | gases (petróleo), fracciones de cabeza craqueadas catalíticamente Gases de petróleo | H K | 270-071-2 | 68409-99-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-193-00-9 | alcanos, C ₁₋₂ Gases de petróleo | H K | 270-651-5 | 68475-57-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-194-00-4 | alcanos, C _{2,3} Gases de petróleo | H K | 270-652-0 | 68475-58-1 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-195-00-X | alcanos, C _{3,4} Gases de petróleo | H K | 270-653-6 | 68475-59-2 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-196-00-5 | alcanos, C _{4,5} Gases de petróleo | H K | 270-654-1 | 68475-60-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-197-00-0 | gases combustibles Gases de petróleo | H K | 270-667-2 | 68476-26-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-198-00-6 | gases combustibles, destilados de petróleo crudo Gases de petróleo | H K | 270-670-9 | 68476-29-9 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-199-00-1 | hidrocarburos, C _{3,4} Gases de petróleo | H K | 270-681-9 | 68476-40-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-200-00-5 | hidrocarburos, C _{4,5} Gases de petróleo | H K | 270-682-4 | 68476-42-6 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-201-00-0 | hidrocarburos, C _{2,4} , ricos en C ₃ Gases de petróleo | H K | 270-689-2 | 68476-49-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-202-00-6 | gases del petróleo, licuados Gases de petróleo | HKS | 270-704-2 | 68476-85-7 | F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | F+; T R: 12-45-46 S: 53-45 | | |
| 649-203-00-1 | gases del petróleo, licuados, desazufrados gases de petróleo desazufrados | HKS | 270-705-8 | 68476-86-8 | F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | F+; T R: 12-45-46 S: 45-53 | | |
| 649-204-00-7 | gases (petróleo), C _{3,4} , ricos en isobutano Gases de petróleo | H K | 270-724-1 | 68477-33-8 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-205-00-2 | destilados (petróleo), C _{3,6} , ricos en piperileno Gases de petróleo | H K | 270-726-2 | 68477-35-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-206-00-8 | gases (petróleo), productos de cabeza del separador de butano Gases de petróleo | H K | 270-750-3 | 68477-69-0 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-207-00-3 | gases (petróleo), C _{2,3} Gases de petróleo | H K | 270-751-9 | 68477-70-3 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-208-00-9 | gases (petróleo) residuos del fondo del despropanizador de gasóleo craqueado catalíticamente, libre de ácidos ricos en C ₄ Gases de petróleo | H K | 270-752-4 | 68477-71-4 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-209-00-4 | gases (petróleo), residuos del fondo del desbutanizador de nafta craqueada catalíticamente, ricos en C _{3,5} Gases de petróleo | H K | 270-754-5 | 68477-72-5 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-210-00-X | gas de cola (petróleo), estabilizador para el fraccionamiento de nafta isomerizada Gases de petróleo | H K | 269-628-2 | 68308-08-7 | Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R45 | T R: 45-46 S: 53-45 | | |
| 649-224-00-6 | combustibles, para motor diesel Gasóleo, sin especificar | H N | 269-822-7 | 68334-30-5 | Carc. Cat. 3; R40 | Xn R: 40 S: (2-)36/37 | | |

ANEXO IC

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|--|---|---|
| 005-009-00-3 | butiltrifenilborato de tetrabutilamonio | | 418-080-4 | 120307-06-4 | R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-56-61 | | |
| 005-010-00-9 | tetraquis(pentafluorofenil)borato de N,N-dimetilaminio | | 422-050-6 | 118612-00-3 | Carc.Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R38-41 | Xn R: 22-38-40-41 S: (2-)22-26-36/37/39 | | |
| 005-012-00-X | Butiltrifenilborato(1-) de dietil[4-[1,5,5-tris(4-dietilaminofenil)penta-2,4-dienilideno]ciclohexa-2,5-dienilideno]amonio | | 418-070-1 | 141714-54-7 | R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 011-007-00-3 | propoxicarbazona de sodio | | - | - | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | C ≥ 2,5 %; N; R50/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; N; R51/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; R52/53 | |
| 013-009-00-X | ((n-butil)x(etil)y-1,5-dihidro)aluminato de sodio x=0,5 y=1,5 | | 418-720-2 | - | F; R11 R14/15 R 17 Xn; R20 C; R35 | F; C R: 11-14/15-17-20-35 S: (1/2-)6-16-26-30-36/37/39-43-45 | | |
| 014-026-00-5 | dicloro-(3-(3-cloro-4-fluorofenil)propil)metilsilano | | 407-180-3 | - | C; R35 | C R: 35 S: (1/2-)26-36/37/39-45 | | |
| 014-027-00-0 | cloro-(3-(3-cloro-4-fluorofenil)propil)dimetilsilano | | 410-270-5 | - | C; R35 | C R: 35 S: (1/2-)8-26-28-36/37/39-45 | | |
| 014-028-00-6 | α-[3-(1-oxoprop-2-enil)-1-oxipropil]dimetoxisiloxi-ω-[3-(1-oxoprop-2-enil)-1-oxipropil]dimetoxisililpoli(dimetilsiloxano) | | 415-290-8 | - | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)24-37 | | |
| 014-029-00-1 | O,O'-(etenilmetilsilileno)di[(4-metilpentan-2-ona)oxima] | | 421-870-1 | - | Repr.Cat.3; R62 Xn; R22-48/22 | Xn R: 22-48/22-62 S: (2-)36/37 | | |
| 014-030-00-7 | [(dimetilsilileno)bis((1,2,3,3a,7a-η)-1H-inden-1-ilideno)dimetil]hafnio | | 422-060-0 | 137390-08-0 | T+; R28 | T+ R: 28 S: (1/2-)6-22-28-36/37-45 | | |
| 014-031-00-2 | bis(1-metilil)-dimetoxisilano | | 421-540-7 | 18230-61-0 | R 10 Xi; R38 R43 R 52-53 | Xi R: 10-38-43-52/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 014-032-00-8 | diciclopentildimetoxisilano | | 404-370-8 | 126990-35-0 | Xi; R38-41 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61 | | |
| 015-180-00-6 | ácido [R-(R*,S*)]-[[2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi]-(4-fenilbutil)fosfoni] acético, (-)-cincomidina (1:1) sal | | 415-820-8 | 137590-32-0 | Xi; R41 R 43 R 52-53 | Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 015-181-00-1 | fosfina | | 232-260-8 | 7803-51-2 | F+; R12 R17 T+; R26 C; R34 N; R50 | F+; T+; N R: 12-17-26-34-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61-63 | | |
| 015-184-00-8 | sal de glifosato, excepto aquellas que expresamente están indicadas en este Anexo | | - | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 015-186-00-9 | metil clorpirifos | | 227-011-5 | 5598-13-0 | R43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)36/37-60-61 | C ≥ 1 %; N; R43-50-53 0,0025 % ≤ C < 1 %; N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %; R52-53 | |
| 015-187-00-4 | Mezcla de: (((2-hidroxietil)imino)bis(metileno))bisfosfonato de tetrasodio, N-óxido; ((tetra-hidro-2-hidroxi-4H-1,4,2-oxazafosforin-4-il)-metil)fosfonato de trisodio, N-óxido, P-óxido | | 417-540-1 | - | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 015-189-00-5 | óxido de fenil bis(2,4,6-trimetilbenzoi)-fosfina | | 423-340-5 | 162881-26-7 | R43 R53 | Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 016-086-00-8 | 10-amino-6,13-dicloro-3-(3-(4-(2,5-disulfonatoanilino)-6-fluoro-1,3,5-triazin-2-ilamino)prop-3-ilamino)-5,12-dioxa-7,14-diazapentaceno-4,11-disulfonato de tetrasodio | | 402-590-9 | 109125-56-6 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)22-26-39 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|---------------------------------------|--|--------------------------|---|
| 016-087-00-3 | Mezcla de: bishexafluorofosfato de tiobis(4,1-fenileno)-S,S,S',S'-tetrafenildisulfonio hexafluorofosfato de difenil(4-feniltiofenil)sulfonio carbonato de propileno | | 403-490-8 | 74227-35-3 | Xi; R36 R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 36-43-50/53 S: (2-)24-26-37-60-61 | | |
| 016-088-00-9 | ácido 4-(bis(4-(dietilamino)fenil)metil)benzeno-1,2-dimetanosulfónico | | 407-280-7 | 71297-11-5 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 016-089-00-4 | Mezcla de ésteres de 5,5',6,6',7,7'-hexahidroxi-3,3,3',3'-tetrametil-1,1'-spirobiindano y 2-diazo-1,2-dihidro-1-oxo-5-sulfonaftaleno | | 413-840-1 | | E; R2 F; R11 R 53 | E R: 2-11-53 S: (2-)33-35-40-61 | | |
| 016-090-00-X | 4-metil-N-(metilsulfonil)benzenosulfonamida | | 415-040-8 | 14653-91-9 | Xn; R22 Xi; R37-41 | Xn R: 22-37-41 S: (2-)26-39 | | |
| 016-091-00-5 | 1-amino-9,10-di-hidro-9,10-dioxo-4-(2,4,6-trimetilanilino)-antraceno-2-sulfonato de tert-alquil(C12-C14)amonio | | 414-110-5 | | Xi; R41 N; R50-53 | Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 016-093-00-6 | Mezcla (2:1) de: tris(6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftalen-1-sulfonato) de 4-(7-hidroxi-2,4,4-trimetil-2-cromanil)resorcinol-4-ilo bis(6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftalen-1-sulfonato) de 4-(7-hidroxi-2,4,4-trimetil-2-cromanil)resorcinol | | 414-770-4 | 140698-96-0 | F; R11 Carc.Cat.3; R40 | F; Xn R: 11-40 S: (2-)7-36/37 | | |
| 016-095-00-7 | Mezcla de: producto de reacción de 4,4'-metilenobis[2-(4-hidroxibencil)-3,6-dimetilfenol] y 6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftalenosulfonato (1:2) Producto de reacción de 4,4'-metilenobis[2-(4-hidroxibencil)-3,6-dimetilfenol] y 6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftalenosulfonato (1:3) | | 417-980-4 | | F; R11 Carc.Cat.3; R40 | F; Xn R: 11-40 S: (2-)7-36/37 | | |
| 016-096-00-2 | tifensulfurón-metilo | | - | 79277-27-3 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 017-015-00-3 | clorhidrato de cloruro de (2-(aminobretil)fenil)acetilo | | 417-410-4 | 61807-67-8 | Xn; R22 C; R35 R43 | C R: 22-35-43 S: (1/2-)26-36/37/39-45 | | |
| 017-016-00-9 | cloruro de metiltrifenilfosfonio | | 418-400-2 | 1031-15-8 | Xn; R21/22 Xi; R38-41 N; R51-53 | Xn; N R: 21/22-38-41-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61 | | |
| 017-017-00-4 | Cloruro de (Z)-13-docosenil-N,N-bis(2-hidroxi-1-til)N-metil-amonio | | 426-210-6 | 120086-58-0 | C; R34 N; R50-53 | C; N R: 34-50/53 S: (2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 017-018-00-X | cloruro de N,N,N-trimetil-2,3-bis(estearoiloxi)propilamonio | | 405-660-7 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 017-019-00-5 | clorhidrato de (R)-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-1-veratrilisoquinolina | | 415-110-8 | 54417-53-7 | Xn; R22 R52-53 | Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61 | | |
| 017-020-00-0 | etilopropoxialuminoclorato | | 421-790-7 | - | C; R35 F; R14/15 | C; F R: 14/15-35 S: (1/2-)16-23-26-30-36/37/39-43-45 | | |
| 017-021-00-6 | cloruro de beenamidopropil-dimetil-(di-hidroxi)propil)amonio | | 423-420-1 | 136920-10-0 | Xi; R41 R43 N; R50-53 | Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61 | | |
| 020-003-00-0 | Mezcla de: (bis(2-hidroxi-5-tetra-propenilfenilmetil)metilamina)di-hidróxido de dicalcio (tris(2-hidroxi-5-tetra-propenilfenilmetil)metilamina)tri-hidróxido de tri-calcio poli(((2-hidroxi-5-tetra-propenilfenilmetil)metilamina)hidróxido de calcio] | | 420-470-4 | - | Xi; R36/38 R43 | Xi R: 36/38-43 S: (2-)24-26-37 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|--|--|--------------------------|---|
| 024-019-00-9 | Componente principal: anilida del ácido acetoacético / 3-amino-1-hidroxibenceno: {6-[(2 o 3 o 4)-amino-(4 o 5 o 6)-hidroxifenilazo]-5'-(fenilsulfamoil)-3-sulfonatonafaleno-2-azobenceno-1,2'-diolato}-[6'-[1-(fenilcarbamoil)etilazo]-5''-(fenilsulfamoil)-3"-sulfonatonafaleno-2"-azobenceno-1",2''-diolato] cromato (III) de trisodio subproducto 1: anilida del ácido acetoacético / 3-amino-1-hidroxibenceno: bis{6-[1-(fenilcarbamoil)etilazo]-5'-(fenilsulfamoil)-3-sulfonatonafaleno-2-azobenceno-1,2'-diolato] cromato (III) de trisodio subproducto 2: 3-amino-1-hidroxibenceno / 3-amino-1-hidroxibenceno: bis{6-[(2 o 3 o 4)-amino-(4 o 5 o 6)-hidroxifenilazo]-5'-(fenilsulfamoil)-3-sulfonatonafaleno-2-azobenceno-1,2'-diolato] cromato (III) de trisodio | | 419-230-1 | - | R 43 R52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 024-020-00-4 | bis[(3'-nitro-5'-sulfonato(6-amino-2-[4-(2-hidroxi-1-naftilazo)fenilsulfonilamino]pirimidin-5-azo)benzeno-2',4'-diolato)]cromato(III) de trisodio | | 418-220-4 | - | R43 R52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 025-005-00-5 | Mezcla de: [29H,31H-ftalocianina-C,C,C-trisulfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) de trisodio [29H,31H-ftalocianina-C,C,C,C-tetrasulfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) de tetrasodio [29H,31H-ftalocianina-C,C,C,C,C-pentasulfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) de pentasodio | | 417-660-4 | - | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 029-012-00-4 | ((N-(3-trimetilamonio)propil)sulfamoil)metilsulfonatoftalocianinato)cobre(II) de sodio | | 407-340-2 | 124719-24-0 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 029-013-00-X | (2-(α -(3-(4-cloro-6-(2-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-óxido-5-sulfonato)fenilazo)encilidenedihidrazino)-4-sulfonato)benzoato)cobre(II) de trisodio | | 407-580-8 | 130201-51-3 | Xi; R41 R52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 030-011-00-6 | tricinc bis(ortofosfato) | | 231-944-3 | 7779-90-0 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 030-013-00-7 | óxido de cinc | | 215-222-5 | 1314-13-2 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 034-003-00-3 | selenito de sodio | | 233-267-9 | 10102-18-8 | T+; R28 T; R23 R31 R43 N; R51-53 | T+; N R: 23-28-31-43-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61 | | |
| 053-005-00-5 | tetraquis(pentafluorofenil)borato (1-) de (4-(1-metiletil)fenil)-(4-metilfenil)yodonio | | 422-960-3 | 178233-72-2 | Xn; R21/22-48/22 N; R50-53 | Xn; N R: 21/22-48/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61 | | |
| 601-056-00-4 | Mezcla de isómeros: metildifenilmetano dimetildifenilmetano | | 405-470-4 | - | Xi; R38 N; R50-53 | Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)37-60-61 | | |
| 601-057-00-X | tosilato de N-dodecil-[3-(4-dimetilamino)benzamido)-propil]dimetilamonio | | 421-130-8 | 156679-41-3 | Xi; R41 R43 N; R50-53 | Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61 | | |
| 601-058-00-5 | di-L-para-menteno | | 417-870-6 | - | Xi; R38 R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)23-24-37-60-61 | | |
| 601-059-00-0 | 2-Bencilideno-3-oxobutirato de metilo | | 420-940-9 | 15768-07-7 | Xi; R36/38 N; R51-53 | Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2-)26-37/39-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|--------------------------------------|-----------------------------------|---|--|--------------------------|---|
| 601-060-00-6 | 1,2-bis[4-fluoro-6-(4-sulfo-5-(2-(4-sulfonafaleno-3-ilazo)-1-hidroxi-3,6-disulfo-8-aminonafaleno-7-ilazo)fenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]etano; sales de x-sodio, y-potasio x=7,755 y=0,245 | | 417-610-1 | 155522-09-1 | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 601-061-00-1 | (etil-1,2-etanodiol)-2-[[[(2-hidroxi)etil]metilamino]acetil]-propil]-omega-(nonilfenoxi)poli[oxi-(metil-1,2-etanodilo)] | | 418-960-8 | - | C; R34 R 43 N; R51-53 | C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61 | | |
| 601-062-00-7 | Mezcla de: triacontano ramificado dotriacontano ramificado tetracontano ramificado hexatriacontano ramificado | | 417-030-9 | 151006-59-6 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 601-063-00-2 | Mezcla de isómeros de tetracosano ramificado | | 417-060-2 | 151006-61-0 | Xn; R20 R53 | Xn R: 20-53 S: (2-)61 | | |
| 601-064-00-8 | hexatriacontano ramificado | | 417-070-7 | 151006-62-1 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 601-065-00-3 | Mezcla de: (1'-alpha,3'-alpha,6'-alpha-2,2,3',7',7'-pentametilspiro(1,3-dioxano-5,2'-norcarano) (1'alpha,3'beta,6'alpha)-2,2,3',7',7'-pentametilspiro(1,3-dioxano-5,2'-norcarano) | | 416-930-9 | - | Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53 | Xn; N R: 41-48/22-51/53 S: (2-)22-26-37/39-61 | | |
| 601-066-00-9 | 1-(4-(trans-4-heptilciclohexil)fenil)etano | | 426-820-2 | 78531-60-9 | R43 R53 | Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 601-067-00-4 | arsenato de trietilo | | 427-700-2 | 15606-95-8 | Carc.Cat.1; R45 T; R23/25 N; R50-53 | T; N R: 45-23/25-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 601-068-00-X | 1,2-diacetoxibut-3-eno | | 421-720-5 | 18085-02-4 | Xn; R22 | Xn R: 22 S: (2-) | | |
| 601-069-00-5 | bromuro de 2-etil-1-(2-(1,3-dioxanil)etil)-piridinio | | 422-680-1 | - | R52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 601-071-00-6 | 1-dimetoximetil-2-nitrobenzeno | | 423-830-9 | 20627-73-0 | R43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 601-073-00-7 | 1-bromo-3,5-difluorobenceno | | 416-710-2 | 461-96-1 | R10 Xn; R22-48/22 Xi; R38 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 10-22-38-43-48/22-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61 | | |
| 601-074-00-2 | Mezcla de: 4-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)-1-metil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano 1-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)-5-metil-6-oxabicyclo[3.2.1]octano espiro[ciclo-hex-3-en-1-il-[(4,5,6,6a-tetra-hidro-3,6',6',6'a-tetrametil)-1,3'(3'aH)-[2H]ciclopenta[b]furano] espiro[ciclo-hex-3-en-1-il-[4,5,6,6A-tetra-hidro-4,6',6',6'A-tetrametil)-1,3'(3'AH)-[2H]ciclopenta[B]]furano] | | 422-040-1 | - | Xi; R36/38 N; R51-53 | Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2-)26-37-61 | | |
| 602-093-00-9 | alpha, alpha, alpha, 4-tetraclorotolueno p-clorobenzotricloruro | E | 226-009-1 | 5216-25-1 | Carc.Cat.2; R45 Repr.Cat.3; R62 T; R48/23 Xn; R21/22 Xi; R37/38 | T R: 45-21/22-37/38-48/23-62 S: 53-45 | | |
| 602-094-00-4 | difenil éter, derivado de octabromo | | 251-087-9 | 32536-52-0 | Repr.Cat.2; R61 Repr.Cat.3; R62 | T R: 61-62 S: 53-45 | | |
| 602-096-00-5 | verde malaquita, clorhidrato; C.I. Verde Básico 4 [1] verde malaquita, oxalato [2] | | 209-322-8 [1] 219-441-7 [2] | 569-64-2 [1] 18015-76-4 [2] | Xn; R22 Xi; R41 Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53 | Xn; N R: 22-41-63-50/53 S: (2-)26-36/37-39-46-60-61 | | |
| 602-097-00-0 | 1-bromo-9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiltio)nonano | | 422-850-5 | 148757-89-5 | R43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 603-167-00-3 | 3,3',5,5'-tetra-terc-butilbifenil-2,2'-diol | | 407-920-5 | 6390-69-8 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 603-168-00-9 | 3-(2-etilhexiloxi)propano-1,2-diol | | 408-080-2 | 70445-33-9 | Xi; R41 R 52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|--------------------------------------|------------------------------------|---|--|---|---|
| 603-169-00-4 | (+/-)-trans-4-(4-fluorofenil)-3-hidroximetil-N-metilpiperidina | | 415-550-0 | 109887-53-8 | Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53 | Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2)-22-26-39-61 | | |
| 603-170-00-X | Mezcla de: 2-metil-1-(6-metilbenciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)pent-1-en-3-ol 2-metil-1-(1-metilbenciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-pent-1-en-3-ol 2-metil-1-(5-metilbenciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)pent-1-en-3-ol | | 415-990-3 | 67739-11-1 | Xi; R36 N; R51-53 | Xi; N R: 36-51/53 S: (2)-26-61 | | |
| 603-171-00-5 | 5-tiazolimetanol | | 414-780-9 | 38585-74-9 | Xi; R41 R 52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2)-26-39-61 | | |
| 603-172-00-0 | trans-butenodioato de mono-2-[2-(4-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)piperazinium-1-il]etoxi]etanol | | 415-180-1 | - | Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53 | Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2)-22-26-39-61 | | |
| 603-173-00-6 | 4,4-dimetil-3,5,8-trioxabicyclo[5.1.0]octano | | 421-750-9 | 57280-22-5 | Xi; R36 R 43 | Xi R: 36-43 S: (2)-26-36/37 | | |
| 603-174-00-1 | 4-ciclo-hexil-2-metil-2-butanol | | 420-630-3 | 83926-73-2 | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2)-26-39-61 | | |
| 603-175-00-7 | 2-(2-hexiloxietoxi) etanol 2-((2-hexiloxi)etoxi)-etanoldietilenglicol monohexil éter 3,6-dioxa-1-dodecanolhexilcarbitol | | 203-988-3 | 112-59-4 | Xn; R21 Xi; R41 | Xn R: 21-41 S: (2)-26-36/37-46 | | |
| 603-176-00-2 | 1,2-bis(2-metoxietoxi) etano TEGDME trietilenglicol dimetil eter triglimo | | 203-977-3 | 112-49-2 | R19 Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62 | T R: 61-19-62 S: 53-45 | | |
| 603-177-00-8 | 1-etoxipronan-2-ol 2PG1EE 1-etoxi-2-propanol propilenglicol monoetil eter [1] 2-etoxi-1-metiletil acetato 2PG1EEA [2] | | 216-374-5 [1] 259-370-9 [2] | 1569-02-4 [1] 54839-24-6 [2] | R10 R67 | R: 10-67 S: (2)-24 | | |
| 603-178-00-3 | 2-hexiloxietanol etilenglicol monohexil éter n-hexilglicol | | 203-951-1 | 112-25-4 | Xn R21/22 C; R34 | C R: 21/22-34 S: (1/2)-26-36/37/39-45 | | |
| 603-179-00-9 | ergocalciferol vitamina D ₂ | | 200-014-9 | 50-14-6 | T+; R26 T; R24/25-48/25 | T+ R: 24/25-26-48/25 S: (1/2)-28-36/37-45 | | |
| 603-180-00-4 | colecalfiferol vitamina D ₃ | | 200-673-2 | 67-97-0 | T+; R26 T; R24/25-48/25 | T+ R: 24/25-26-48/25 S: (1/2)-28-36/37-45 | | |
| 603-181-00-X | metil <i>tert</i> -butil éter MTBE 2-metoxi-2-metilpropano | | 216-653-1 | 1634-04-4 | F; R11 Xi; R38 | F; Xi R: 11-38 S: (2)-9-16-24 | | |
| 603-183-00-0 | 2-[2-(2-butoxietoxi)etoxi]etanol TEGBE trietilenglicol monobutil éter butoxi trietilenglicol | | 205-592-6 | 143-22-6 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2)-26-39-46 | C ≥ 30 %: Xi; R41 20 % ≤ C < 30 %: Xi; R36 | |
| 603-184-00-6 | 2-(hidroximetil)-2-[[2-hidroxi-3-(isooctadeciloxi)propoxi]metil]-1,3-propanodiol | | 416-380-1 | 146925-83-9 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 603-185-00-1 | 2,4-dicloro-3-etil-6-nitrofenol | | 420-740-1 | 99817-36-4 | T; R25 Xi; R41 R43 N; R50-53 | T; N R: 25-41-43-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 603-186-00-7 | trans-(5RS,6SR)-6-amino-2,2-dimetil-1,3-dioxepan-5-ol | | 419-050-3 | 79944-37-9 | R 43 | Xi R: 43 S: (2)-22-24/25-26-37 | | |
| 603-187-00-2 | dicloruro de 2-((4,6-bis(4-(2-(1-metilpiridinio-4-il)vinil)fenilamino)-1,3,5-triazin-2-il)(2-hidroxietil)amino)etanol | | 419-360-9 | 163661-77-6 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 603-189-00-3 | Mezcla de complejos de: titanio, 2,2'-oxidietanol, lactato de amonio, nitrilotris(2-propanol) y etilenglicol | | 405-250-8 | NYA | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 603-191-00-4 | 2-(4,6-bis(2,4-dimetilfenil)-1,3,5-triazin-2-il)-5-(3-(2-etilhexil)oxi)-2-hidroxipropoxi]fenol | | 419-740-4 | 137658-79-8 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 603-195-00-6 | 2-[4-(4-Metoxifenil)-6-fenil-1,3,5-triazin-2-il]-fenol | | 430-810-3 | 154825-62-4 | R52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|--|--|---|
| 603-196-00-1 | 2-(7-Etil-1H-indol-3-il)etanol | | 431-020-1 | 41340-36-7 | Xn; 22-48/22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2-)-36/37/39-61 | | |
| 603-197-00-7 | 1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-3-(1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol | | 403-640-2 | 107534-96-3 | Repr.Cat.3; R63 Xn; R22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-51/53-63 S: (2-)-22-36/37-61 | | |
| 603-199-00-8 | etoxazol | | - | 153233-91-1 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | C ≥ 0.25 %: N; R50/53 0.025 % ≤ C < 0.25 %: N; R51/53 0.0025 % ≤ C < 0.025 %: R52/53 | |
| 604-065-00-1 | 4,4',4''-(1-metilpropan-1-il-3-ilideno)tris(2-ciclohexil-5-metilfenol) | | 407-460-5 | 111850-25-0 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 604-066-00-7 | Mezcla de: fenol, 6-(1,1-dimetiletil)-4-tetrapropil-2-[(2-hidroxi-5-tetra-propilfenil)metil (C41) y metano, 2,2'-bis[6-(1,1-dimetil-etil)-1-hidroxi-4-tetrapropil-fenil)]- (C45) 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-tetrapropil-fenol y 2-(1,1-dimetiletil)-4-tetrapropil-fenol 2,6-bis[(6-(1,1-dimetiletil)-1-hidroxi-4-tetrapropilfenil)metil]-4-(tetrapropil)fenol y 2-[(6-(1,1-dimetiletil)-1-hidroxi-4-tetrapropilfenil)metil]-6-[1-hidroxi-4-tetrapropilfenil)metil]-4-(tetrapropil)fenol | | 414-550-8 | NYA | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 604-067-00-2 | Mezcla de: 2,2'-[[[(2-hidroxi-etil)imino]bis(metileno)bis[4-dodecilfenol] formaldehído, oligómero con 4-dodecilfenol y 2-aminoetanol(n=2) formaldehído, oligómero con 4-dodecilfenol y 2-aminoetanol(n=3, 4 o más) | | 414-520-4 | NYA | Xi; R38-41 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)-26-37/39-60-61 | | |
| 604-068-00-8 | (+/-)-4-[2-[[3-(4-hidroxifenil)-1-metilpropil]amino]-1-hidroxi-etil]fenol hidrocloreuro | | 415-170-5 | 99095-19-9 | Xn; R20/22 R 43 | Xn R: 20/22-43 S: (2-)-24-26-37 | | |
| 604-069-00-3 | 2-(1-metilpropil)-4-terc-butilfenol | | 421-740-4 | 51390-14-8 | C; R34 N; R51-53 | C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)-26-36/37/39-45-61 | | |
| 605-031-00-9 | Mezcla de: 2,2-dimetoxietanal (esta sustancia se considera anhidra en términos de identidad, estructura y composición. Sin embargo, el 2,2-dimetoxietanal existe en forma hidratada. 60% de la forma anhidra es equivalente a 70,4% de la forma hidratada) agua (incluida el agua libre y el agua de hidratación de 2,2-dimetoxietanal) | | 421-890-0 | NYA | R43 | Xi R: 43 S: (2-)-24-37 | | |
| 606-062-00-0 | tetrahidro-2H-pirano-3-carboxaldehído | | 407-330-8 | 61571-06-0 | Repr.Cat.2; R61 Xi; R41 R 52-53 | T R: 61-41-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 606-063-00-6 | (E)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluorofenil)propenal | | 410-980-5 | 112704-51-5 | Xi; R36 R 43 | Xi R: 36-43 S: (2-)-24-26-37 | | |
| 606-064-00-1 | pregn-5-eno-3,20-diona bis(etilenoquetalo) | | 407-450-0 | 7093-55-2 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 606-065-00-7 | 1-(4-morfolinofenil)butan-1-ona | | 413-790-0 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 606-066-00-2 | (E)-5-[(4-clorofenil)metil]-2,2-dimetilciclopentanona | | 410-440-9 | 131984-21-9 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 606-067-00-8 | Mezcla de: 1-(2,3,6,7,8,9-hexahidro-1,1-dimetil-1H-benz(g)inden-4-il)etanona 1-(2,3,5,6,7,8-hexahidro-1,1-dimetil-1H-benz(f)inden-4-il)etanona 1-(2,3,6,7,8,9-hexahidro-1,1-dimetil-1H-benz(g)inden-5-il)etanona 1-(2,3,6,7,8,9-hexahidro-3,3-dimetil-1H-benz(g)inden-5-il)etanona | | 414-870-8 | 96792-67-5 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|---|--------------------------|---|
| 606-068-00-3 | 2,7,11-trimetil-13-(2,6,6-trimetilciclo-hex-1-en-1-il)trideca-hexaen-2,4,6,8,10,12-al | | 415-770-7 | 1638-05-7 | Xn; R48/22 R 43 R 52-53 | Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-)22-36/37-61 | | |
| 606-069-00-9 | espiro[1,3-dioxolano-2,5'-(4',4',8',8'-tetrametil-hexahidro-3',9'-metanonaftaleno)] | | 415-460-1 | 154171-77-4 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 24-61 | | |
| 606-070-00-4 | 5-(3-butiril-2,4,6-trimetilfenil)-2-[1-(etoxiimino)propil]-3-hidroxiciclohex-2-en-1-ona | | 414-790-3 | 138164-12-2 | Repr.Cat.3; R62-63 Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53 | Xn; N R: 22-38-62-63-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61 | | |
| 606-071-00-X | 17-espiro(5,5-dimetil-1,3-dioxan-2-il)androsta-1,4-dien-3-ona | | 421-050-3 | 13258-43-0 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 22-60-61 | | |
| 606-072-00-5 | 3-acetil-1-fenilpirrolidina-2,4-diona | | 421-600-2 | 719-86-8 | Xn; R48/22 N; R51-53 | Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)22-36/37-61 | | |
| 606-073-00-0 | 4,4'-bis-(dimetialamino) benzofenona cetona de Michler 4,4 tetrametil diaminobenzofenona | | 202-027-5 | 90-94-8 | Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 Xi; R41 | T R: 45-41-68 S: 53-45 | | |
| 606-075-00-1 | 1-bencil-5-etoxiimidazolidina-2,4-diona | | 417-340-4 | 65855-02-9 | Xn; R22 | Xn R: 22 S: (2-)22 | | |
| 606-076-00-7 | 1-((2-quinolinil-carbonil)oxi)-2,5-pirrolidinodiona | | 418-630-3 | 136465-99-1 | Xi; R41 R43 | Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39 | | |
| 606-077-00-2 | (3S,4S)-3-hexil-4-[(R)-2-hidroxitridecil]-2-oxetanona | | 418-650-2 | 104872-06-2 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 606-078-00-8 | 1-octilazepin-2-ona | | 420-040-6 | 59227-88-2 | C; R34 R 43 N; R51-53 | C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | | |
| 606-079-00-3 | 2-n-butyl-benzo[d]isotiazol-3-ona | | 420-590-7 | - | C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 606-080-00-9 | Producto de la reacción de 3-hidroxi-5,7-di-tert-butilbenzofuran-2-ona con o-xileno | | 417-100-9 | - | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 606-081-00-4 | (3β, 5α, 6β)-3-(acetiloxi)-5-bromo-6-hidroxi-androstan-17-ona | | 419-790-7 | 4229-69-0 | R43 R52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-36/37-61 | | |
| 606-082-00-X | Mezcla de: butan-2-ona oxima sin-O,O'-di(butan-2-ona oxima)dietoxisilano | | 406-930-7 | 96-29-7 | T; R48/22 R43 R52-53 | T R: 43-48/25-52/53 S: (1/2-)25-36/37-45-61 | | |
| 606-083-00-5 | 2-cloro-5-sec-hexadecil-hidroquinona | | 407-750-1 | - | Xi; R36/38 R43 R52-53 | Xi R: 36/38-43-52/53 S: (2-)24-26-37-61 | | |
| 606-084-00-0 | 1-(4-metoxi-5-benzofuranil)-3-fenil-1,3-propanodiona | | 414-540-3 | 484-33-3 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 606-085-00-6 | (1R,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona | | 418-530-1 | 79200-56-9 | Xn; R22 Xi; R41 R43 | Xn R: 22-41-43 S: (2-)24-26-37/39 | | |
| 606-086-00-1 | 1-(3,3-dimetilciclo-hexilo)pent-4-en-1-eno | | 422-330-8 | 56973-87-6 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 606-087-00-7 | 6-etil-5-fluoro-4(3H)-pirimidona | | 422-460-5 | 137234-87-8 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61 | | |
| 606-088-00-2 | 2,4,4,7-tetrametil-6-octen-3-ona | | 422-520-0 | 74338-72-0 | Xi; R38 N; R51-53 | Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61 | | |
| 606-089-00-8 | Mezcla de: 1,4-diamino-2-cloro-3-fenoxiantraquinona 1,4-diamino-2,3-bisfenoxiantraquinona | | 423-220-2 | 12223-77-7 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 606-091-00-9 | 6-cloro-5-(2-cloroetil)-1,3-dihidroindol-2-ona | | 421-320-0 | 118289-55-7 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 606-092-00-4 | Mezcla de: (E)-oxaciclo-hexadec-12-en-2-ona (E)-oxaciclo-hexadec-13-en-2-ona a) (Z)-oxaciclo-hexadec-(12)-en-2-ona, b) (Z)-oxaciclo-hexadec-(13)-en-2-ona | | 422-320-3 | 111879-80-2 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---------------------------------|--|--------------------------|---|
| 607-379-00-7 | Mezcla de: 2-[N-(2-hidroxi)etil]stearamido]etil stearato sodio [bis[2-(stearoiloxi)etil]amino]metilsulfonato sodio [bis(2-hidroxi)etil]amino]metilsulfonato N,N-bis(2-hidroxi)etil]stearamida | | 401-230-8 | 55349-70-7 | R52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-380-00-2 | Mezcla de: 1,2-bis(hexiloxycarbonil)etanosulfonato de amonio 1-hexiloxycarbonil-2-octiloxycarboniletanosulfonato de amonio 2-hexiloxycarbonil-1-octiloxycarboniletanosulfonato de amonio | | 407-320-3 | - | Xi; R38-41 R 52-53 | Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61 | | |
| 607-381-00-8 | Mezcla de triésteres de 2,2-bis(hidroxi)metil]butanol con ácido C7-alcanoico y ácido 2-etilhexanoico | | 413-710-4 | - | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-382-00-3 | ácido 2-((4-amino-2-nitrofenil)amino)benzoico | | 411-260-3 | 117907-43-4 | Xi; R41 R 43 R 52-53 | Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 607-383-00-9 | Mezcla de: hexadecanoato de 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ilo octadecanoato de 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ilo | | 415-430-8 | 86403-32-9 | Xi; R41 R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61 | | |
| 607-384-00-4 | Mezcla de: ésteres de alcoholes ramificados C14-C15 con ácido 3,5-di-t-butil-4-hidroxifenilpropiónico 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxibencenopropanoato de alquilo lineal y ramificado C15 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxibencenopropanoato de alquilo lineal y ramificado C13 | | 413-750-2 | 171090-93-0 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-385-00-X | Copolímero de alcohol vinílico y acetato de vinilo parcialmente acetilado con metilsulfato de 4-(2-(4-formilfenil)etenil)-1-metilpiridinio | | 414-590-6 | 125229-74-5 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-386-00-5 | Mezcla de: ácido tetradecanoico (42.5-47.5%) ésteres de poli(1-7)lactato de l'ácido tetradecanoico (52.5-57.5%) | | 412-580-6 | 174591-51-6 | Xi; R38-41 R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61 | | |
| 607-387-00-0 | Mezcla de: ácido dodecanoico (35-40%) ésteres de poli(1-7)lactato y de ácido dodecanoico (60-65%); | | 412-590-0 | 58856-63-6 | Xi; R38-41 R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61 | | |
| 607-388-00-6 | ácido 4-etilamino-3-nitrobenzoico | | 412-090-2 | 2788-74-1 | Xn; R22 R 43 R 52-53 | Xn R: 22-43-52/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 607-389-00-1 | N,N-bis(carboximetil)-3-amino-2-hidroxi)propanoato de trisodio | | 414-130-4 | 119710-96-2 | Xn; R22 | Xn R: 22 S: (2-)22 | | |
| 607-390-00-7 | 1,2,3,4-tetra-hidro-6-nitroquinolina | | 414-270-6 | 41959-35-7 | Xn; R22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)22-61 | | |
| 607-391-00-2 | ciclopropano-1,1-dicarboxilato de dimetilo | | 414-240-2 | 6914-71-2 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-392-00-8 | 4-((5-ciano-1,6-dihidro-2-hidroxi-1,4-dimetil-6-oxo-3-piridinil)azo)benzoato de 2-fenoxietilo | | 414-260-1 | 88938-37-8 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-393-00-3 | ácido 3-(cis-1-propenil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxílico | | 415-750-8 | 106447-44-3 | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-394-00-9 | ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico | | 413-260-9 | 5521-55-1 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 607-395-00-4 | Mezcla de: 1-tridecil-4-allyl-(2-3)-sulfobutandioato de sodio 1-dodecil-4-allyl-(2 o 3)-sulfobutandioato de sodio | | 410-230-7 | - | C; R34 R 43 N; R51-53 | C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|--|--------------------------|---|
| 607-396-00-X | 2-(4-metoxibencilideno)malonato de bis(1,2,2,6,6-pentametil-4-piperidino) | | 414-840-4 | 147783-69-5 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 22-60-61 | | |
| 607-397-00-5 | Mezcla de: salicilatos de calcio (alquilados con cadenas de C10-14 y C18-30 ramificadas) fenatos de calcio (alquilados con cadenas de C10-14 y C18-30 ramificadas) fenatos de calcio sulfurizados (alquilados con cadenas de C10-14 y C18-30 ramificadas) | | 415-930-6 | - | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)36/37 | | |
| 607-398-00-0 | N-(5-cloro-3-(4-(dietilamino)-2-metilfenilimino)-4-metil-6-oxo-1,4-ciclohexadienil)carbamato de etilo | | 414-820-5 | 125630-94-6 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-399-00-6 | 3-metil-3-butenilpropanoato de 2,2-dimetilo | | 415-610-6 | 104468-21-5 | Xi; R38 R52-53 | Xi R: 38-52/53 S: (2-)37-61 | | |
| 607-400-00-X | 3-[[[di(2-butilamino)tióxometil]tio]propanoato de metilo | | 414-400-1 | 32750-89-3 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-401-00-5 | 3-hidroxi-5-oxo-3-ciclohexeno-1-carboxilato de etilo | | 414-450-4 | 88805-65-6 | Xi; R38-41 R 43 | Xi R: 38-41-43 S: (2-)24-26-37/39 | | |
| 607-402-00-0 | N-(feniloxicarbonil)-L-valinato de metilo | | 414-500-5 | 153441-77-1 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-403-00-6 | Mezcla de: succinato de bis(1S,2S,4S)-(1-bencil-4-terc-butoxicarboxamido-2-hidroxi-5-fenil)pentilammonio alcohol isopropílico | | 414-810-0 | - | Xn; R48/22 Xi; R41 N; R50-53 | Xn; N R: 41-48/22-50/53 S: (2-)22-26-36/39-60-61 | | |
| 607-404-00-1 | Mezcla de: ácido ((Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienil)oxicarbonilpropanoico butandioato de di-((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo) butandioato de di-((Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo) butandioato de (Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo ácido ((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienil)oxicarbonilpropanoico | | 415-190-4 | - | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)24-37 | | |
| 607-405-00-7 | p-hidroxibenzoato de 2-hexildecilo | | 415-380-7 | 148348-12-3 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-406-00-2 | 2,5-diclorobenzoato de potasio | | 415-700-5 | - | Xn; R22 Xi; R41 | Xn R: 22-41 S: (2-)26-39 | | |
| 607-407-00-8 | 2-carboxi-3-(2-tienil)propionato de etilo | | 415-680-8 | 143468-96-6 | Xi; R38-41 R 43 | Xi R: 38-41-43 S: (2-)24-26-37/39 | | |
| 607-408-00-3 | N-(4-fluorofenil)glicinato de potasio | | 415-710-1 | - | Xn; R48/22 Xi; R41 R 43 R 52-53 | Xn R: 41-43-48/22-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61 | | |
| 607-409-00-9 | Mezcla de: ácido (3R)-[1S-(1 α , 2 α , 6 β)-(2S)-2-metil-1-oxo-butoxi]-8 α .gamma.hexahidro-2,6-dimetil-1-naftaleno]-3,5-dihidroxi-heptanoico Biomasa inerte de Aspergillus terreus | | 415-840-7 | - | R 43 R 52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)36/37-61 | | |
| 607-410-00-4 | 2-(hexadec-2-enil)butanodioato de mono[2-(dimetilamino)etil]monohidrogeno y/o 3-(hexadec-2-enil)butanodioato de mono[2-(dimetilamino)etil]monohidrogeno | | 415-880-5 | - | Xi; R38-41 R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61 | | |
| 607-411-00-X | oxiranometanol, 4-metilbencenosulfonato, (S)- | | 417-210-7 | 70987-78-9 | Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 Xi; R41 R43 N; R51-53 | T; N R: 45-41-43-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 607-412-00-5 | 2-(1-cianociclohexil)acetato de etilo | | 415-970-4 | 133481-10-4 | Xn; R22-48/22 R 52-53 | Xn R: 22-48/22-52/53 S: (2-)36/37-61 | | |
| 607-413-00-0 | trans-4-fenil-L-prolina | | 416-020-1 | 96314-26-0 | Repr.Cat.3; R62" R 43 | Xn R: 43-62 S: (2-)22-36/37 | | |
| 607-414-00-6 | tris(2-etilhexilo)-4,4',4''-(1,3,5-triazina-2,4,6-triiltriimino)tribenzoato | | 402-070-1 | 88122-99-0 | R53 | R: 53 S: 61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|---|--|--|--|--------------------------|---|
| 607-415-00-1 | poli-(metil metacrilato)-co-(butilmetacrilato)-co-(4-acriloxibutil-isopropenil- α,α,α -dimetilbencil carbamato)-co-(anhídrido maleico) | | 419-590-1 | - | F; R11 R 43 | F; Xi R: 11-43 S: (2-)24-37-43 | | |
| 607-416-00-7 | 4-(2-carboximetil)etoxi-1-hidroxi-5-isobutiloxycarbonilamino-N-(3-dodeciloxipropil)-2-naftamida | | 420-730-7 | - | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-418-00-8 | 4-aminobenzoato de 2-etilhexilo | | 420-170-3 | 26218-04-2 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-419-00-3 | ácido (3'-carboximetil-5-(2-(3-etil-3H-benzotiazol-2-ilideno)-1-metil-etilideno)-4,4'-dioxo-2'-tioxo-(2,5')bitiazolidiniliden-3-il)-acético | | 422-240-9 | 166596-68-5 | Xi; R41 R 43 | Xi R: 41-43 S: (2-)26-36/37/39 | | |
| 607-420-00-9 | ácido 2,2-bis(hidroxi)metil)butanoico | | 424-090-1 | 10097-02-6 | Xi; R41 R52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 607-421-00-4 | cipermetrina <i>cis/trans</i> +/- 40/60 (\pm)- α -ciano-3-fenoxibencil-(\pm)- <i>cis,trans</i> -3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato | | 257-842-9 | 52315-07-8 | Xn; R20/22 Xi; R37 N; R50-53 | Xn; N R: 20/22-37-50/53 S: (2-)24-36/37/39-60-61 | | |
| 607-422-00-X | α -cipermetrina | | 257-842-9 | 67375-30-8 | T; R25 Xn; R48/22 Xi; R37 N; R50-53 | T; N R: 25-37-48/22-50/53 S: (2-)36/37/39-45-60-61 | | |
| 607-423-00-5 | ésteres de mecoprop y de p-mecoprop | | - | - | Xn; R22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)13-36/37-60-61 | | |
| 607-424-00-0 | trifloxistrobin (ISO) metil éster del ácido (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamina] propiónico | | - | 141517-21-7 | R43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-46-60-61 | | |
| 607-425-00-6 | metalaxil (ISO) metil N-(2,6-dimetilfenil)-N-(motoxiacetil)-DL-alaninato | | 260-979-7 | 57837-19-1 | Xn; R22 R43 R52-53 | Xn R: 22-43-52/53 S: (2-)13-24-37-46-61 | | |
| 607-426-00-1 | dipentilester del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, ramificado y lineal [1] ftalato de n-pentil-isopentilo [2] ftalato de dipentilo [3] ftalato de diisopentilo [4] | | 284-032-2 [1] - [2] 205-017-9 [3] 210-088-4 [4] | 84777-06-0 [1] - [2] 131-18-0 [3] 605-50-5 [4] | Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50 | T; N R: 60-61-50 S: 53-45-61 | | |
| 607-427-00-7 | bromoxinil heptanoato (ISO) 2,6-dibromo-4-cianofenil heptanoato | | 260-300-4 | 56634-95-8 | Repr. Cat.3; R63 Xn; R20/22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 20/22-43-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | | |
| 607-430-00-3 | bencil butil ftalato | | 201-622-7 | 85-68-7 | Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62 N; R50-53 | T; N R: 61-62-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 607-431-00-9 | praletina ETOC 2-metil-4-oxo-3-(prop-2-inil) ciclopent-2-eno-1-il 2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil) ciclopropanocarboxilato | | 245-387-9 | 23031-36-9 | T; R23 Xn; R22 N; R50-53 | T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)45-60-61 | | |
| 607-432-00-4 | S-metolaclor mezcla de (S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metoxi-1-metil-etiol)-acetamida (80-100%) [1] mezcla de (S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metoxi-1-metil-etiol)-acetamida (0-20%) [2] | | - [1] - [2] | 87392-12-9 [1] 178961-20-1 [2] | R43 N; R50-53 | Xn; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 607-433-00-X | cipermetrina <i>cis/trans</i> +/- 80/20 (RS)- α -ciano-3-fenoxibencil (1RS, 3RS, 1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato) | | 257-842-9 | 52315-07-8 | Xn; R22 Xi; R37/38 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-37/38-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61 | | |
| 607-434-00-5 | mecoprop-p [1] y sus sales ácido (R)-2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico | | 240-539-0 | 16484-77-8 | Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53 | Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)13-26-37/39-46-61 | | |
| 607-435-00-0 | 2,2-dihidroxiacetato de 2S-isopropil-5R-metil-1R-ciclohexilo | | 416-810-6 | 111969-64-3 | Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53 | Xn; N R: 41-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/39-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---------------------------|---|--------------------------|---|
| 607-436-00-6 | neodecanoato de 2-hidroxi-3-(2-etil-4-metilimidazol)propilo | | 417-350-9 | - | Xi; R38-41 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-28-37/39-60-61 | | |
| 607-437-00-1 | ácido 3-(4-aminofenil)-2-ciano-2-propenoico | | 417-480-6 | - | R43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-438-00-7 | 2-[(aminosulfonil)metil]benzoato de metilo | | 419-010-5 | - | Xn; R22 Xi; R36 | Xn R: 22-36 S: (2-)22-26 | | |
| 607-439-00-2 | tetra-hidro-2-furanocarboxilato de metilo | | 420-670-1 | 37443-42-8 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 607-440-00-8 | 2-aminosulfonil-6-(trifluorometil)piridina-3-carboxilato de metilo | | 421-220-7 | 144740-59-0 | R43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 607-441-00-3 | ácido 3-[3-(2-dodeciloxi-5-metilfenilcarbamoil)-4-hidroxi-1-naftilil]propiónico | | 421-490-6 | 167684-63-1 | R53 | R: 53 S: 57-61 | | |
| 607-442-00-9 | acetato de bencilo y [hidroxi-(4-fenilbutil)fosfinito] | | 416-050-5 | 87460-09-1 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-36/39 | | |
| 607-443-00-4 | bis(2,4-di-terc-butil-6-metilfenil)etilfosfato | | 416-140-4 | 145650-60-8 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-444-00-X | Mezcla de: dibenzoato de cis-1,4-dimetilciclohexilodi dibenzoato de trans-1,4-dimetilciclohexilo | | 416-230-3 | 35541-81-2 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-445-00-5 | Tris(4-metilbencenosulfonato) de hierro (III) | | 420-960-8 | 77214-82-5 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)24-26-39 | | |
| 607-446-00-0 | 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-3-(1-oxopropil)amino]fenilaminopropionato de metilo | | 416-240-8 | 155522-12-6 | R 43 R 53 | Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 607-447-00-6 | 4-[4-(4-hidroxifenilazo)fenilamino]-3-nitrobencenosulfonato de sodio | | 416-370-5 | 156738-27-1 | R 43 R52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 607-448-00-1 | ácido 2,3,5,6-tetrafluorobenzoico | | 416-800-1 | 652-18-6 | Xi; R38-41 | Xi R: 38-41 S: (2-)22-26-37/39 | | |
| 607-449-00-7 | Mezcla de: 4,4',4''-[(2,4,6-trioxo-1,3,5(2H,4H,6H)-triazina-1,3,5-triil)tris(metileno(3,5,5-trimetil-3,1-ciclohexanodil)iminocarboniloxi-2,1-etanodil(etil)amino)]trisbenceno diazoniotri[bis(2-metilpropil)naftalenosulfonato] 4,4',4'',4'''-[[5,5'-[carbonilbis(imino(1,5,5-trimetil-3,1-ciclohexanodil)metileno)]-2,4,6-trioxo-1,3,5(2H,4H,6H)-triazina-1,1',3,3'-tetrail]tetraquis(metileno(3,5,5-trimetil-3,1-ciclohexanodil)iminocarboniloxi-2,1-etanodil(etil)amino)]tetraquisbencenodiazoniotetra[bis(2-metilpropil)naftalenosulfonato] | | 417-080-1 | - | E; R2 R43 N; R50-53 | E; Xi; N R: 2-43-50/53 S: (2-)24-35-37-60-61 | | |
| 607-450-00-2 | isopropoxiiminoacetato de 2-mercaptobenzotiazolil(Z)-(2-aminotiazol-4-il)-2-(tertbutoxicarbonilo) | | 419-040-9 | 89604-92-2 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-451-00-8 | ácido 4-[4-amino-5-hidroxi-3-(4-(2-sulfoxietilsulfonil)fenilazo)-2,7-disulfonafto-6-ilazo]-6-[3-(4-amino-5-hidroxi-3-(4-(2-sulfoxietilsulfonil)fenilazo)-2,7-disulfonafto-6-ilazo)fenilcarbonilamino]benceno sulfónico, sal de sodio | | 417-640-5 | 161935-19-9 | Xi; R41 R43 | Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39 | | |
| 607-453-00-9 | bis(2,2-dimetiloctanoato) de 4-bencil-2,6-di-hidroxi-4-azaheptileno | | 418-100-1 | 172964-15-7 | R 43 R 53 | Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 607-454-00-4 | Mezcla de: ácido trans-2-(1-metiletil)-1,3-dioxano-5-carboxílico; ácido cis-2-(1-metiletil)-1,3-dioxano-5-carboxílico | | 418-170-3 | - | Xi; R41 R52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)25-26-39-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|---|--|--------------------------|---|
| 607-455-00-X | ácido 1-amino-4-(3-[4-cloro-6-(2,5-disulfonofenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2,2-dimetilpropilamino)-antraquinona-2-sulfónico, sal de sodio/litio | | 419-520-8 | 172890-93-6 | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-456-00-5 | ácido 3-amino-4-clorobenzoico, éster hexadecílico | | 419-700-6 | 143269-74-3 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-457-00-0 | di-hidrógeno-1,1"-di-hidroxi-8,8"-[p-fenilbis(imino-6-[4-(2-aminoetil)piperazin-1-il)]-1,3,5-triazina-4,2-diil-imino)]bis(2,2'-azonaftaleno-1',3,6-trisulfonato) de tetrasodio | | 420-350-1 | 172277-97-3 | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 607-458-00-6 | Mezcla de: 2-etil-[2,6-dibromo-4-[1-[3,5-dibromo-4-(2-hidroxietoxi)fenil]-1-metiletil]fenoxi]propenoato dipropenoato de 2,2'-diel-[4,4'-bis(2,6-dibromofenoxi)-1-metiletilideno] 2,2'-[(1-metiletilideno)bis[2,6-dibromo-4,1-fenileno)oxi]etanol]] | | 420-850-1 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-459-00-1 | 4-{2-[5-ciano-1,2,3,6-tetra-hidro-1-(2-isopropoxietoxi-carbonilmetil)-4-metil-2,6-dioxo-3-piridilideno]hidrazino}benzoato de isopentilo | | 418-930-4 | - | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-460-00-7 | 9-octadecenoato de 3-trideciloxipropilamonio | | 418-990-1 | - | Xn; R48/22 Xi; R36/38 N; R50-53 | Xn; N R: 36/38-48/22-50/53 S: (2-)23-26-37/39-60-61 | | |
| 607-461-00-2 | Mezcla de: 2-{4-[3-metil-4-[6-sulfonato-4-(2-sulfonato-fenilazo)-naftalen-1-ilazo]-fenilamino]-6-[3-(2-sulfato-etanosulfonil)-fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-benceno-1,4-disulfonato de pentasodio 2-{4-[3-metil-4-[7-sulfonato-4-(2-sulfonato-fenilazo)-naftalen-1-ilazo]-fenilamino]-6-[3-(2-sulfato-etanosulfonil)-fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-benceno-1,4-disulfonato de pentasodio | | 421-160-1 | - | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-462-00-8 | Mezcla de: acetato de 1-hexilo acetato de 2-metil-1-pentilo acetato de 3-metil-1-pentilo acetato de 4-metil-1-pentilo mezclas de otros acetatos de alquilo(C6) lineales y ramificados | | 421-230-1 | 88230-35-7 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-463-00-3 | ácido 3-(fenotiazin-10-il)propiónico | | 421-260-5 | 362-03-8 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 24/25-61 | | |
| 607-464-00-9 | Mezcla de: ácido 7-cloro-1-etil-6-fluoro-1,4-di-hidro-4-oxo-quinolina-3-carboxílico ácido 5-cloro-1-etil-6-fluoro-1,4-di-hidro-4-oxo-quinolina-3-carboxílico | | 421-280-4 | 68077-26-9 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-465-00-4 | 7-{4-[4-(2-cianoamino-4-hidroxi-6-oxidopirimidin-5-ilazo)benzamido]-2-etoxi-fenilazo}naftaleno-1,3-disulfonato de tris(2-hidroxietil)amonio | | 421-440-3 | - | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-466-00-X | Mezcla de: 1-(1-[2-cloro-5-(hexadeciloxycarbonil)fenilcarbamoi]-3,3-dimetil-2-oxobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetra-hidrobenzotriazol-5-carboxilato de fenilo 2-(1-(2-cloro-5-(hexadeciloxycarbonil)fenilcarbamoi)-3,3-dimetil-2-oxobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetra-hidrobenzotriazol-5-carboxilato de fenilo 3-(1-(2-cloro-5-(hexadeciloxycarbonil)fenilcarbamoi)-3,3-dimetil-2-oxobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetra-hidrobenzotriazol-5-carboxilato de fenilo | | 421-480-1 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 37/39-61 | | |
| 607-467-00-5 | 1,3-diestañooxidicaprilito de 1,1,3,3-tetrabutilo | | 419-430-9 | 56533-00-7 | Xn; R21/22-48/22 C; R34 N; R50-53 | C; N R: 21/22-34-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|--|--|--------------------------|---|
| 607-468-00-0 | Mezcla de: 4-((4-(5-sulfonato-2-metoxifenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino)-2-((1,4-dimetil-6-óxido-2-oxo-5-sulfonatometil-1,2-dihidropiridina-3-il)azo)benzenosulfonato de monosodio 4-((4-(5-sulfonato-2-metoxifenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino)-2-((1,4-dimetil-6-óxido-2-oxo-5-sulfonatometil-1,2-dihidropiridina-3-il)azo)benzenosulfonato de disodio 4-((4-(5-sulfonato-2-metoxifenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino)-2-((1,4-dimetil-6-óxido-2-oxo-5-sulfonatometil-1,2-dihidropiridina-3-il)azo)benzenosulfonato de trisodio 4-((4-(5-sulfonato-2-metoxifenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino)-2-((1,4-dimetil-6-óxido-2-oxo-5-sulfonatometil-1,2-dihidropiridina-3-il)azo)benzenosulfonato de tetrasodio | | 419-450-8 | - | R43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-469-00-6 | 7-((4,6-bis(3-dietilaminopropilamino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)-4-hidroxi-3-(4-(4-sulfonatofenilazo)fenilazo)-2-naftaleno sulfonato de disodio | | 419-460-2 | 120029-06-3 | R52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 607-470-00-1 | 6,13-dicloro-3,10-bis[2-[4-[3-(2-hidroxisulfoniloxietanosulfonil)fenilamino]-6-(2,5-disulfonatofenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]etilamino]benzo[5,6][1,4]oxazino[2,3-b]fenoaxazina-4,11-disulfonato de potasio y sodio | | 414-100-0 | - | Xi; R41 R52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)39-22-26-61 | | |
| 607-472-00-2 | trimetilendiaminotetraacetato de amonio y hierro(III), hemihidrato | | 400-660-3 | 111687-36-6 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-474-00-3 | ácido (4-(4-(4-dimetilaminobenciliden-1-il)-3-metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il)benzoico | | 410-430-4 | 117573-89-4 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-475-00-9 | Mezcla (50/50) de: 7-(4-[4-cloro-6-[metil-(3-sulfonatofenil)amino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-ureidofenilazo)naftaleno-1,3,6-trisulfonato de tetrasodio 7-(4-[4-cloro-6-[metil-(4-sulfonatofenil)amino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-ureidofenilazo)naftaleno-1,3,6-trisulfonato de tetrasodio | | 412-940-2 | 148878-18-6 | R43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-476-00-4 | N,N-bis(carboximetil)-β-alanina de trisodio | | 414-070-9 | 129050-62-0 | C; R34 R52-53 | C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | | |
| 607-478-00-5 | flato de tetrametilamonio e hidrogeno | | 416-900-5 | 79723-02-7 | T; R25 Xn; R48/22 N; R50 | T; N R: 25-48/22-50 S: (1/2-)25-36-45-61 | | |
| 607-479-00-0 | 4-cloro-3-[2-(5,5-dimetil-2,4-dioxo-1,3-oxazolidin-3-il)-4,4-dimetil-3-oxopentamido]benzoato de hexadecilo | | 418-550-9 | 168689-49-4 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-480-00-6 | 1,2-benceno dicarboxílico di-C7-11-ramificado y lineal alkilesteres del ácido | | 271-084-6 | 68515-42-4 | Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 | T R: 61-62 S: 53-45 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|--------------------------------|--|--------------------------|---|
| 607-487-00-4 | Mezcla de: 4-(3-etoxicarbonil-4-(5-(3-etoxicarbonil-5-hidroxi-1-(4-sulfonato)fenil)pirazol-4-il)enta-2,4-dienilideno)-4,5-dihidro-5-oxopirazol-1-il)benenosulfonato de disodio 4-(3-etoxicarbonil-4-(5-(3-etoxicarbonil-5-oxido-1-(4-sulfonato)fenil)pirazol-4-il)enta-2,4-dienilideno)-4,5-dihidro-5-oxopirazol-1-il)benenosulfonato de trisodio | | 402-660-9 | - | Repr.Cat.2; R61 R52-53 | T R: 61-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 607-488-00-X | (2-acetilamino-5-fluoro-4-isotiocianatofenoxi)acetato de etilo | | 414-210-9 | 147379-38-2 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-489-00-5 | Mezcla de: linolenato, linoleato y oleato de 2-etilhexilo epoxioleato de 2-etilhexilo diepoxilinooleato de 2-etilhexilo triepoxilinooleato de 2-etilhexilo | | 414-890-7 | 71302-79-9 | R43 | Xi R: 43 S: (2-)24-37 | | |
| 607-490-00-0 | glicinato de N-[2-hidroxi-3-(C12-16-alquilooxi)propil]-N-metilo | | 415-060-7 | - | Xi; R41 R43 | Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39 | | |
| 607-492-00-1 | propilopropanoato de 2-(1-(3',3'-dimetil-1'-ciclohexil)etoxi)-2-metilo | | 415-490-5 | 141773-73-1 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 607-493-00-7 | (3aR,4R,7aR)-2-metil-4-(1S,2R,3-triacetoxipropil)-3a,7a-dihidro-4H-pirano[3,4-d]oxazol-6-carboxilato de metilo | | 415-670-3 | 78850-37-0 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 607-494-00-2 | octilfosfonato de bis(2-etilhexilo) | | 417-170-0 | 52894-02-7 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-495-00-8 | 4-sulfofenil-6-((1-oxononil)amino)hexanoato de sodio | | 417-550-6 | 168151-92-6 | R43 | Xi R: 43 S: (2-)24-37 | | |
| 607-496-00-3 | fosfito de 2,2'-metilenbis(4,6-diterc-butil-fenil)-2-etilhexilo | | 418-310-3 | 126050-54-2 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-497-00-9 | isoestearato de oxido de cerio | | 419-760-3 | - | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-498-00-4 | hexadecanoato de (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo | | 421-370-3 | 3681-73-0 | Xi; R38 R53 | Xi R: 38-53 S: (2-)37-61 | | |
| 607-499-00-X | 1,2-etanodiol-bis(2-hexadecenilsuccinato) de bis(dimetil-(2-hidroxi)etil)amonio | | 421-660-1 | - | Xi; R41 R43 N; R51-53 | Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 607-500-00-3 | 2,2-bis[(5-tetrapropileno-2-hidroxi)fenil]etanoato de calcio | | 421-670-4 | - | Xi; R38 N; R50-53 | Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)37-60-61 | | |
| 607-501-00-9 | Mezcla de: tiofosfato de trifenilo y derivados terciarios de fenilo butilado | | 421-820-9 | - | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 607-502-00-4 | 4-dodecibencenosulfonato de (N-bencil-N,N,N-tri)butilamonio | | 422-200-0 | - | C; R34 Xn; R22 N; R51-53 | C; N R: 22-34-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | | |
| 607-503-00-X | 2,4,6-tri-n-propil-2,4,6-trioxo-1,3,5,2,4,6-trioxatrisforinano | | 422-210-5 | 68957-94-8 | C; R34 | C R: 34 S: (1/2-)26-36/37/39-45 | | |
| 607-505-00-0 | 7-(4-(4-(5-amino-4-sulfonato-2-(4-(2-(sulfonato)etoxi)sulfonil)fenilazo)fenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino-2-ureidofenilazo)naftaleno-1,3,6-trisulfonatoftaleno-1,3,6-trisulfonato de pentasodio | | 422-930-1 | 171599-84-1 | R52-53 | R: 52/53 S: 22-61 | | |
| 607-506-00-6 | Mezcla de: (4-cloro-2-((4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1-(3-sulfonato)fenil)-1H-pirazol-4-il)azo)-5-metil)benenosulfonato de estroncio (4-cloro-2-((4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1-(3-sulfonato)fenil)-1H-pirazol-4-il)azo)-5-metil)benenosulfonato de disodio | | 422-970-8 | 136248-04-9 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 22-61 | | |
| 607-507-00-1 | 2,4-diamino-3-[4-(2-sulfonatoetoxisulfonil)fenilazo]-5-[4-(2-sulfonatoetoxisulfonil)-2-sulfonato]fenilazo]-benenosulfonato de potasio/sodio | | 422-980-2 | 187026-95-5 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)22-26-39 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|--------------------------------|--|--------------------------|---|
| 607-508-00-7 | 3,3'-[iminobis[sulfonil-4,1-fenileno-(5-hidroxi-3-metilpirazol-1,4-diil)azo-4,1-fenileno]sulfonilimino-(4-amino-6-hidroxipirimidina-2,5-diil)azo-4,1-fenileno]sulfonilimino(4-amino-6-hidroxipirimidina-2,5-diil)azo]bis(bencenosulfonato)] de disodio | | 423-110-4 | - | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)22-26-39 | | |
| 607-512-00-9 | 2,4-diamino-3,5-bis-[4-(2-sulfonatoetoxi)sulfonil]fenilazo]bencenosulfonato de trisodio | | 423-970-0 | 182926-43-8 | R52-53 | R: 52/53 S: 22-61 | | |
| 607-513-00-4 | Mezcla de: 4-Benzoilamino-6-(6-etenosulfonil-1-sulfato-naftaleno-2-ilazo)-5-hidroxi-naftaleno-2,7-disulfonato trisódico Ácido 5-(benzoilamino)-4-hidroxi-3-((1-sulfo-6-(2-(sulfooxi)etil)sulfonil)-2-naftil)azo)naftaleno-2,7-disulfónico sal de sodio Sál sódica de ácido 5-(benzoilamino)-4-hidroxi-3-((1-sulfo-6-(2-(sulfooxi)etil)sulfonil)-2-naftil)azo)naftaleno-2,7-disulfónico. | | 423-200-3 | NYA | Xi; R41 R43 R52-53 | Xi R: 41-43-52/53 S: 22-26-36/37/39-61 | | |
| 607-515-00-5 | Mezcla de: Disulfonato disódico de éter hexildifenílico Disulfonato disódico de éter dihexildifenílico | | 429-650-7 | 147732-60-3 | Xi; R36 N; R51-53 | Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61 | | |
| 607-516-00-0 | N,N'-bis(trifluoroacetil)-S,S'-bis-L-homocisteína | | 429-670-6 | 105996-54-1 | Xi; R41 R43 | Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39 | | |
| 607-517-00-6 | Ácido (S)- α -(acetiltio)bencenopropanoico | | 430-300-0 | 76932-17-7 | Xn; R22 Xi; R41 R43 | Xn R: 22-41-43 S: (2-)22-26-36/37/39 | | |
| 607-526-00-5 | cartap | | - | 15263-53-3 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 607-527-00-0 | Mezcla de: dodecanodioato de 1-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-tridecafluoroetil) 12-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-tridecafluoroetil) dodecanodioato de 1-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-tridecafluoroetil) 12-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-heptadecafluorodecilo) dodecanodioato de 1-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-tridecafluoroetil) 12-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-heneicosafuorododecilo) dodecanodioato de 1-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-tridecafluoroetil) 12-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-pentacosafuorotetradecilo) dodecanodioato de 1-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-heptadecafluorodecil) 12-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-heptadecafluorodecilo) dodecanodioato de 1-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-heptadecafluorodecil) 12-(1 ¹ H,1 ¹ H,2 ¹ H,2 ¹ H-heneicosafuorododecilo) | | 423-180-6 | - | Xn; R48/22 | Xn R: 48/22 S: (2-)36 | | |
| 608-031-00-7 | 2-bencil-2-metil-3-butenitrilo | | 407-870-4 | 97384-48-0 | Xn; R22 R 52-53 | Xn R: 22-52/53 S: (2-)61 | | |
| 608-033-00-8 | N-butyl-3-(2-cloro-4-nitrofenilhidrazono)-1-ciano-2-metilprop-1-eno-1,3-dicarboximida | | 407-970-8 | 75511-91-0 | R 43 R 52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 608-034-00-3 | Clorfenapir 4-Bromo-2-(4-clorofenil)-1-etoximetil-5-trifluorometilpirrol-3-carbonitrilo | | - | 122453-73-0 | T; R23 Xn; R22 N; R50-53 | T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)13-36/37-45-60-61 | | |
| 608-035-00-9 | (+/-)- α -(2-acetil-5-metilfenil)-amino]-2,6-diclorobenceno-acetonitrilo | | 419-290-9 | - | R43 R53 | Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|--|--------------------------|---|
| 608-036-00-4 | 3-(2-{4-[2-(4-Cianofenil)vinil]fenil}vinil)benzocarbonitrilo | | 419-060-8 | 79026-02-1 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 608-037-00-X | Mezcla de: (E)-2,12-tridecadienonitrilo (E)-3,12-tridecadienonitrilo (Z)-3,12-tridecadienonitrilo | | 422-190-8 | 124071-40-5 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 608-038-00-5 | 2,2,4-trimetil-4-fenilbutanonitrilo | | 422-580-8 | 75490-39-0 | Xn; R22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61 | | |
| 608-039-00-0 | 2-fenil-hexanonitrilo | | 423-460-8 | 3508-98-3 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)23-60-61 | | |
| 608-040-00-6 | 4,4'-ditiobis(5-amino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-3-carbonitrilo) | | 423-490-1 | 130755-46-3 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 608-041-00-1 | 4'-(2-butil-4-oxo-1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-3-il)metil(1,1'-bifenil)-2-carbonitrilo | | 423-500-4 | 138401-24-8 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 608-043-00-2 | 3-(cis-3-hexeniloxi)propanonitrilo | | 415-220-6 | 142653-61-0 | T; R23 Xn; R22 N; R50-53 | T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)13-36/37-45-60-61 | | |
| 609-064-00-X | mesotrióna (2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexanediona) | | - | 104206-82-8 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 609-066-00-0 | 3-amino-10-[4-(10-amino-6,13-dicloro-4,11-disulfonatobenzo[5,6][1,4]oxazino[2,3-b]fenoxazino-3-ilamino)-6-metil(2-sulfonatoetil)amino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-6,13-diclorobenzo[5,6][1,4]oxazino[2,3-b]fenoxazina-4,11-disulfonato de litio y sodio | | 418-870-9 | 154212-58-5 | Xn; R20/21/22-68/20/21/22 | Xn R: 20/21/22-68/20/21/22 S: (2-)36/37 | | |
| 609-067-00-6 | 4-(3-aminopropilamino)-2,6-bis[3-(4-metoxi-2-sulfonilfenilazo)-4-hidroxi-2-sulfo-7-naftilamino]-1,3,5-triazina de sodio y potasio | | 416-280-6 | 156769-97-0 | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 609-068-00-1 | almizcle-xileno 5- <i>tert</i> -butil-2,4,6-trinitro- <i>m</i> -xileno | | 201-329-4 | 81-15-2 | Carc. Cat. 3; R40 E; R2 N; R50-53 | E; Xn; N R: 2-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | | |
| 609-070-00-2 | 1,4-dicloro-2-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)-5-nitrobenzoceno | | 415-580-4 | 130841-23-5 | Xn; R22 R 43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61 | | |
| 609-071-00-8 | Mezcla de: 2-metilsulfanil-4,6-bis(2-hidroxi-4-metoxi-fenil)-1,3,5-triazina 2-(4,6-bis-metilsulfanil-1,3,5-triazin-2-il)-5-metoxifenol | | 423-520-3 | 156137-33-6 | R43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-099-00-0 | dicloruro de (metilenbis(4,1-fenilenazo(1-(3-(dimetilamino)propil)-1,2-dihidro-6-hidroxi-4-metil-2-oxopiridin-5,3-dil)))-1,1'-dipiridinio, diclorhidrato | | 401-500-5 | - | Carc. Cat. 2; R45 N; R51-53 | T; N R: 45-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 611-100-00-4 | 3,3'-(3-(o4)-metil-1,2-fenilenbis(imino(6-cloro)-1,3,5-triazina-4,2-dilimino(2-acetamido-5-metoxi)-4,1-fenilenazo)dinaftaleno-1,5-disulfonato de potasio y sodio | | 403-810-6 | 140876-13-7 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 611-101-00-X | 2'-(4-cloro-3-ciano-5-formil-2-tienil)azo-5'-dietilaminoacetanilida | | 405-200-5 | 104366-25-8 | R43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-103-00-0 | (1-(3-carboxilato-2-oxido-5-sulfonatofenilazo)-5-hidroxi-7-sulfonatoaftalen-2-amido)níquel(II) de trisodio | | 407-110-1 | - | Xi; R41 R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|-------------------|--|--------------------------|---|
| 611-104-00-6 | Mezcla de: (2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi)fenolato(2(o 4 o 6)-(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi-4(o 2 o 6)-(4-(4-nitro-2-sulfonatoanilino)fenilazo)fenolato) ferrato(1-) de trisodio bis(2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi)fenolato) ferrato(1-) de trisodio (2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi)fenolato(2(o 4 o 6)-(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi-4(o 2 o 6)-(4-nitro-2-sulfonato)fenilazo)fenolato) ferrato(1-) de trisodio (2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi)fenolato(2(o 4 o 6)-(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi-4(o 2 o 6)-(3-sulfonato)fenilazo)fenolato) ferrato(1-) de trisodio 3,3'-(2,4-dihidroxi-1,3(o 1,5 o 3,5)-fenilenedi)azobencenosulfonato de disodio | | 406-870-1 | - | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 611-105-00-1 | 4-(4-cloro-6-(N-etil)anilino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-(1-(2-clorofenil)-5-hidroxi-3-metil-1H-pirazol-4-il)azobenzensulfonato de sodio | | 407-800-2 | 136213-75-7 | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 611-106-00-7 | 4,4'-dihidroxi-3,3'-bis[2-sulfonato-4-(4-sulfonato)fenilazo]fenilazo]-7,7'[p-fenilenobis(imino(6-cloro-1,3,5-triazina-4,2-diil)imino)]dinaftaleno-2-sulfonato de hexasodio | | 410-180-6 | - | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 611-107-00-2 | 4-(4-cloro-6-(3,6-disulfonato-7-(5,8-disulfonato-naftaleno-2-ilazo)-8-hidroxi-naftaleno-1-ilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-5-hidroxi-6-(4-(2-sulfatoetanosulfonil)-fenilazo)-naftaleno-1,7-disulfonato de potasio y sodio | | 412-490-7 | - | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-108-00-8 | 5-((4-(4-cloro-3-sulfonato)fenilazo)-1-naftil)azo)-8-(fenilamino)-1-naftaleno-sulfonato de disodio | | 413-600-6 | 6527-62-4 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 611-109-00-3 | Productos de reacción de: sulfato de cobre(II) y 2,4-bis[6-(2-metoxi-5-sulfonato)fenilazo]-5-hidroxi-7-sulfonato-2-naftilamino]-6-(2-hidroxietilamino)-1,3,5-triazina de tetrasodio (2:1) | | 407-710-3 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 611-110-00-9 | 4,4'-bis-(8-amino-3,6-disulfonato-1-naftol-2-ilazo)-3-metilazobenceno de tetrasodio/litio | | 408-210-8 | 124605-82-9 | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-28-37-61 | | |
| 611-111-00-4 | 2-[[4-(2-cloroetil)fenil]-[(2-hidroxi-5-sulfo-3-[3-(2-(sulfoxi)etil)fenil]etilazo)-4-sulfobenzato(3-)cuprato(1-)] de disodio | | 414-230-8 | - | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-112-00-X | 4-hidroxi-5-[4-[3-(2-sulfatoetansulfonil)fenilamino]-6-morfolin-4-il-1,3,5-triazin-2-ilamino]-3-(1-sulfonato)naftaleno-2-ilazo]naftaleno-2,7-disulfonato de tetrasodio | | 413-070-6 | - | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-113-00-5 | (2-(((5-(2,5-diclorofenil)azo)-2-hidroxi)fenil)metileno)amino)benzato(2-))2-((4,5-di-hidro-3-metil-5-oxo-1-fenil-1H-pirazol-4-il)azo)-5-sulfobenzato(3-) cromato(2-) de litio y sodio | | 414-280-0 | 149626-00-6 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 24/25-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|-------------------------------|--|--------------------------|---|
| 611-114-00-0 | (4-((5-cloro-2-hidroxifenil)azo)-2,4-di-hidro-5-metil-3H-pirazol-3-onato(2-))3-((4,5-di-hidro-3-metil-1-(4-metilfenil)-5-oxo-1H-pirazol-4-il)azo)-4-hidroxi-5-nitrobenzenosulfonato(3-)) cromato(2-) de litio y sodio | | 414-250-7 | 149564-66-9 | Xn; R22 Xi; R41 R 52-53 | Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61 | | |
| 611-115-00-6 | bis(4-((4-(dietilamino)-2-hidroxifenil)azo)-3-hidroxi-1-naftalenosulfonato(3-))cromato(3-) de trilitio | | 414-290-5 | 149564-65-8 | Xn; R22 R 52-53 | Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61 | | |
| 611-116-00-1 | Mezcla de: 5-{4-cloro-6-[2-(2,6-dicloro-5-cianopirimidin-4-ilamino)-propilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino}-4-hidroxi-3-(1-sulfonatonaftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-disulfonato de trisodio 5-{4-cloro-6-[2-(2,6-dicloro-5-cianopirimidin-4-ilamino)-1-metil-etilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino}-4-hidroxi-3-(1-sulfonatonaftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-disulfonato de trisodio 5-{4-cloro-6-[2-(4,6-dicloro-5-cianopirimidin-2-ilamino)-propilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino}-4-hidroxi-3-(1-sulfonatonaftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-disulfonato de trisodio 5-{4-cloro-6-[2-(4,6-dicloro-5-cianopirimidin-2-ilamino)-1-metil-etilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino}-4-hidroxi-3-(1-sulfonatonaftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-disulfonato de trisodio | | 414-620-8 | - | Xi; R41 R 43 | Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39 | | |
| 611-117-00-7 | 1,3-bis(6-fluoro-4-[1,5-disulfo-4-(3-aminocarbonil-1-etil-6-hidroxi-4-metil-pirid-2-on-5-ilazo)-fenil-2-ilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino)propano sal de litio y sodio | | 415-100-3 | 149850-29-3 | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-118-00-2 | 1,2-bis[4-[4-(4-sulfofenilazo)-2-sulfofenilazo]-2-ureido-fenilamino]-6-fluoro-1,3,5-triazin-2-ilamino]propano, sal de sodio | | 413-990-8 | 149850-31-7 | R 43 | Xi R: 43 S: (2-)22-24-37 | | |
| 611-119-00-8 | 4-[4-cloro-6-(4-metil-2-sulfofenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-6-(4,5-dimetil-2-sulfofenilazo)-5-hidroxinaftaleno-2,7-disulfonato de tetrasodio | | 415-400-4 | 148878-22-2 | Xi; R41 R 43 | Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39 | | |
| 611-120-00-3 | ácido 5-{4-[5-amino-2-[4-(2-sulfoxietilsulfoni)fenilazo]-4-sulfo-fenilamino]-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino}-4-hidroxi-3-(1-sulfonafalen-2-ilazo)-naftaleno-2,7-disulfónico, sal de sodio | | 418-340-7 | 157707-94-3 | Xi; R41 R 52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)22-26-39-61 | | |
| 611-121-00-9 | Componente principal 6 (isómero): asim. 1:2 cromo(III)-complejo: A: ácido 3-hidroxi-4-(2-hidroxi-naftaleno-1-ilazo)-naftaleno-1-sulfónico, sal de sodio y B: 1-[2-hidroxi-5-(4-metoxi-fenilazo)-fenilazo]-naftaleno-2-ol Componente principal 8 (isómero): asim. 1:2 cromo-complejo: A: ácido 3-hidroxi-4-(2-hidroxi-naftaleno-1-ilazo)-naftaleno-1-sulfónico, sal de sodio y B: 1-[2-hidroxi-5-(4-metoxi-fenilazo)-fenilazo]-naftaleno-2-ol | | 417-280-9 | 30785-74-1 | Xi; R41 N; R50-53 | Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 611-122-00-4 | (di[N-(3-(4-[5-(5-amino-3-metil-1-fenilpirazol-4-il-azo)-2,4-disulfo-anilino]-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino)fenil)-sulfamoi]([disulfo)-ftalcianinato]níquel de hexasodio | | 417-250-5 | 151436-99-6 | Xi; R41 R 43 | Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|---|---|--------------------------|---|
| 611-123-00-X | lactato de 3-(2,4-bis(4-((5-(4,6-bis(2-aminopropilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-hidroxi-2,7-disulfonaftalen-3-il)azo)fenilamino)-1,3,5-triazin-6-ilamino)propildietilamonio | | 424-310-4 | 178452-66-9 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 611-124-00-5 | Mezcla de: 5-amino-3-(5-[4-cloro-6-[4-(2-sulfoxi-etoxisulfonato)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonato)fenilazo)-6-[5-(2,3-dibromopropionilamino)-2-sulfonato)fenilazo]-4-hidroxi-naftaleno-2,7-disulfonato de pentasodio 5-amino-6-[5-(2-bromoacrililamino)-2-sulfonato)fenilazo]-3-(5-[4-cloro-6-[4-(2-sulfoxi-etoxisulfonato)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonato)fenilazo)-4-hidroxi-naftaleno-2,7-disulfonato de pentasodio 5-amino-3-[5-[4-cloro-6-[4-(vinilsulfonil)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonato)fenilazo]-6-[5-(2,3-dibromopropionilamino)-2-sulfonato)fenilazo]-4-hidroxi-naftaleno-2,7-disulfonato de tetrasodio | | 424-320-9 | 180778-23-8 | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 611-125-00-0 | Mezcla de: complejo de cobre (II) de la sal de disodio del ácido 4-((8-oxido-7-(2-óxido-4-etenilsulfonil)-5-(metoxifenil)azo)-6-sulfonato)naftalen-2-ilazo)-5-oxo-1-(4-sulfonato)fenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxílico complejo de cobre (II) de la sal de disodio del ácido 4-((8-oxido-7-(2-óxido-4-(2-hidroxi-etilsulfonil)-5-(metoxifenil)azo)-6-sulfonato)naftalen-2-ilazo)-5-oxo-1-(4-sulfonato)fenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxílico | | 423-940-7 | - | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 611-126-00-6 | 2,6-bis(2-(4-(4-amino-fenilamino)-fenilazo)-1,3-dimetil-3H-imidazolio)-4-dimetilamino-1,3,5-triazina, dicloruro | | 424-120-1 | 174514-06-8 | Xi; R41 N; R50-53 | Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 611-127-00-1 | 4-amino-6-(5-(4-(2-etilfenilamino)-6-(2-sulfatoetanosulfonil)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-sulfonato)fenilazo)-5-hidroxi-3-(4-(2-sulfatoetanosulfonil)fenilazo)naftaleno-2,7-disulfonato de pentasodio | | 423-790-2 | - | R 5 Xi; R41 R 43 R 52-53 | Xi R: 5-41-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-41-61 | | |
| 611-128-00-7 | N,N'-bis{6-cloro-4-[6-(4-vinilsulfonil)fenilazo]-2,7-(ácido disulfónico)-5-hidroxi-nafto-4-ilamino]-1,3,5-triazin-2-il}-N-(2-hidroxi-etil)etano-1,2-diamina, sal de sodio | | 419-500-9 | 171599-85-2 | Xi; R41 R 43 | Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39 | | |
| 611-129-00-2 | Mezcla de: ácido 5-[(4-[(7-amino-1-hidroxi-3-sulfo-2-naftil)azo]-2,5-dietoxifenil)azo]-2-[(3-fosfonofenil)azo]benzoico Ácido 5-[(4-[(7-amino-1-hidroxi-3-sulfo-2-naftil)azo]-2,5-dietoxifenil)azo]-3-[(3-fosfonofenil)azo]benzoico | | 418-230-9 | 163879-69-4 | E; R2 Repr.Cat.3; R62 Xn; R48/22 R 43 N; R51-53 | E; Xn; N R: 2-43-48/22-62-51/53 S: (2-)26-35-36/37-61 | | |
| 611-130-00-8 | 2-[6-[7-(2-carboxilato-fenilazo)-8-hidroxi-3,6-disulfonato-1-naftilamino]-4-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino] benzoato de tetramonio | | 418-520-5 | 183130-96-3 | Xi; R36 N; R50-53 | Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 611-131-00-3 | 2-[2-hidroxi-3-(2-clorofenil)carbamoil-1-naftilazo]-7-[2-hidroxi-3-(3-metilfenil)carbamoil-1-naftilazo]fluoren-9-ona | | 420-580-2 | - | Repr.Cat.2; R61 R 53 | T R: 61-53 S: 53-45-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|--|---|---|---|
| 611-132-00-9 | bis{7-[4-(1-butil-5-ciano-1,2-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridilazo)fenilsulfonilamino]-5'-nitro-3,3'-disulfonatoftaleno-2-azobenceno-1,2'-diolato} cromato (III) de pentasodio | | 419-210-2 | - | Xi; R41 R 52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 611-133-00-4 | Producto por proceso (product-by-process): complejo de hierro de colorantes azoicos obtenidos por acoplamiento con resorcina de una mezcla de 2-amino-1-hidroxibenceno-4-sulfanilida diazotizada y 2-amino-1-hidroxibenceno-4-sulfonamida, mezcla sometida posteriormente a una segunda reacción de acoplamiento con una mezcla de ácido 3-aminobenceno-1-sulfónico diazotizado (ácido metanílico) y ácido 4'-amino-4-nitro-1,1'-difenilamina-2-sulfónico y metalización con cloruro férrico, sal de sodio | | 419-260-5 | - | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 611-134-00-X | 2-{[2-hidroxi-3-[4-cloro-6-[4-(2,3-dibromopropionilamino)-2-sulfonato]fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-5-sulfonato]fenilazo}-bencilideno-hidrazino]-4-sulfonato]benzoato de trisodio, complejo de cobre | | 423-770-3 | - | Xi; R41 N; R51-53 | Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)22-26-39-61 | | |
| 611-135-00-5 | Producto de la reacción de: ácido 2-[[4-amino-2-ureidofenilazo]-5-[(2-(sulfooxi)etil)sulfonil]]bencenosulfónico con 2,4,6-trifluoropirimidina, seguida de hidrólisis parcial del derivado vinilsulfonílico correspondiente, Mezcla de sal de potasio/sodio | | 424-250-9 | - | Xi; R41 R52-53 | Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61 | | |
| 611-136-00-0 | formato de 2-[4-(2-propilaminoamónio)-6-[4-hidroxi-3-(5-metil-2-metoxi-4-sulfamoilfenilazo)-2-sulfonato]nafto-7-ilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-aminopropilo | | 424-260-3 | -- | Repr.Cat.3; R62 Xi; R41 N; R51-53 | Xn; N R: 41-62-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61 | | |
| 611-137-00-6 | 6-terc-butil-7-cloro-3-tridecil-7,7a-di-hidro-1H-pirazolo[5,1-c]-1,2,4-triazol | | 419-870-1 | 159038-16-1 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 611-138-00-1 | 2-(4-aminofenil)-6-terc-butil-1H-pirazolo[1,5-b][1,2,4]triazol | | 415-910-7 | 152828-25-6 | R43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 611-140-00-2 | azafenidina | | - | 68049-83-2 | T; R48/22 Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 N; R50-53 | T; N R: 61-48/22-62-50/53 S: 53-45-60-61 | C ≥ 0.025 %: N; R50/53 0.0025 % ≤ C < 0.025 %: N; R51/53 0.00025 % ≤ C < 0.0025 %: R52/53 | |
| 612-184-00-5 | 6'-(dibutilamino)-3'-metil-2'-(fenilamino)espiro[isobenzofuran-1(3H),9(9H)-xanten]-3-ona | | 403-830-5 | 89331-94-2 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 612-185-00-0 | ioduro de 1-[3-[4-((heptadecafluorononil)oxi)-benzamido]propil]-N,N,N-trimetilamónio | | 407-400-8 | 59493-72-0 | Xi; R41 N; R50-53 | Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 612-186-00-6 | sulfato de bis(N-(7-hidroxi-8-metil-5-fenilfenazin-3-ilideno)dimetilamónio) | | 406-770-8 | 149057-64-7 | Xn; R48/22 Xi; R41 R 43 N; R50-53 | Xn; N R: 41-43-48/22-50/53 S: (2-)22-26-36/37/39-60-61 | | |
| 612-187-00-1 | 2,3,4-trifluoroanilina | | 407-170-9 | 3862-73-5 | Xn; R21/2-48/22 Xi; R38-41 N; R51-53 | Xn; N R: 21/22-38-41-48/22-51/53 S: (2-)23-26-36/37/39-61 | | |
| 612-188-00-7 | 4,4'-(9H-fluoreno-9-ilideno)bis(2-cloroanilina) | | 407-560-9 | 107934-68-9 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 612-189-00-2 | clorhidrato de 4-amino-2-(aminometil)fenol | | 412-510-4 | 135043-64-0 | Xn; R22 R 43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)22-24-37-60-61 | | |
| 612-190-00-8 | 4,4'-metilenobis(2-isopropil-6-metilnilina) | | 415-150-6 | 16298-38-7 | Xn; R48/22 N; R51-53 | Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)36-61 | | |
| 612-191-00-3 | Polímero de clorhidrato de alilamina | | 415-050-2 | 71550-12-4 | Xn; R22 R 43 | Xn R: 22/43 S: (2-)36/37 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--------------------------------|--------------------------------|--|--|--------------------------|---|
| 612-192-00-9 | 2-isopropil-4-(N-metil)aminometiltiazol | | 414-800-6 | 154212-60-9 | Xn; R21/22 Xi; R38-41 N; R51-53 | Xn; N R: 21/22-38-41-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61 | | |
| 612-193-00-4 | 3-metilaminometilfenilamina | | 414-570-7 | 18759-96-1 | Xn; R21/22 C; R34 R 43 N; R50-53 | C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 612-194-00-X | cloruro de 2-hidroxi-3-[(2-hidroxietil)-[2-(1-oxotetradecil)amino]etil]amino]-N,N,N-trimetil-1-propanamónio | | 414-670-0 | 141890-30-4 | Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53 | Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 612-195-00-5 | 1,5-naftalenodisulfonato de bis[tributil(4-metilbencil)amónio] | | 415-210-1 | - | Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53 | Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-36/39-60-61 | | |
| 612-196-00-0 | 4-cloro- <i>o</i> -toluidina [1] clorhidrato de 4-cloro- <i>o</i> -toluidina [2] | E | 202-441-6 [1] 221-627-8 [2] | 95-69-2 [1] 3165-93-3 [2] | Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 T; R23/24/25 N; R50-53 | T; N R: 45-23/24/25-68-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 612-197-00-6 | 2,4,5-trimetilanilina [1] clorhidrato de 2,4,5-trimetilanilina [2] | E | 205-282-0 [1] - [2] | 137-17-7 [1] 21436-97-5 [2] | Carc.Cat.2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53 | T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 612-198-00-1 | 4,4'-tiodianilina y sus sales | E | 205-370-9 | 139-65-1 | Carc.Cat.2; R45 Xn; R22 N; R51-53 | T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 612-199-00-7 | 4,4'-oxidianilina y sus sales 4,4'-diaminodifenil éter | E | 202-977-0 | 101-80-4 | Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.2; R46 Repr.Cat.3; R62 T; R23/24/25 N; R51-53 | T; N R: 45-46-23/24/25-62-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 612-200-00-0 | 2,4-diaminoanisola 4-metoxi-1,3-fenilendiamina [1] 2,4-diaminoanisola sulfato [2] | | 210-406-1 [1] 254-323-9 [2] | 615-05-4 [1] 39156-41-7 [2] | Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 Xn; R22 N; R51-53 | T; N R: 45-22-68-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 612-201-00-6 | <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-4,4'-metilendianilina | | 202-959-2 | 101-61-1 | Carc.Cat.2; R45 N; R50-53 | T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 612-202-00-1 | 3,4-dicloroanilina | | 202-448-4 | 95-76-1 | T; R23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50-53 | T; N R: 23/24/25-41-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 612-204-00-2 | C.I. Violeta básico 3 4-[4,4'-bis(dimetilamino)bencilhidrolideno]ciclohexa-2,5-dieno-1-ilideno] dimetilamonio cloruro hexametilparrosanilina cloruro Violeta Cristal hexametil-p-rosanilina cloruro | | 208-953-6 | 548-62-9 | Carc.Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53 | Xn; N R: 22-40-41-50/53 S: (2-)26-36/37/39-46-60-61 | | |
| 612-205-00-8 | C.I. Violeta básico 3 con $\geq 0.1\%$ de la cetona de Michler (EC no. 202-027-5) | E | 208-953-6 | 548-62-9 | Carc.Cat.2; R45 Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53 | T; N R: 45-22-41-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 612-206-00-3 | famoxodona 3-anilino-5-metil-5-(4-fenoxifenil)-1,3-oxazolidin-2,4-diona | | - | 131807-57-3 | Xn; R48/22 N; R50-53 | Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)46-60-61 | | |
| 612-209-00-X | 6-metoxi- <i>m</i> -toluidina <i>p</i> -cresidina | E | 204-419-1 | 120-71-8 | Carc.Cat.2; R45 Xn; R22 | T R: 45-22 S: 53-45 | | |
| 612-210-00-5 | 5-nitro- <i>o</i> -toluidina [1] 5-nitro- <i>o</i> -toluidina clorhidrato [2] | | 202-765-8 [1] 256-960-8 [2] | 99-55-8 [1] 51085-52-0 [2] | Carc.Cat.3; R40 T; R23/24/25 R52-53 | T R: 23/24/25-40-52/53 S: (1/2-)36/37-45-61 | | |
| 612-211-00-0 | N-[(benzotriazol-1-il)metil]-4-carboxibencenosulfonamida | | 416-470-9 | - | Xi; R36 N; R51-53 | Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61 | | |
| 612-212-00-6 | 2,6-dicloro-4-trifluorometilanilina | | 416-430-0 | 24279-39-8 | Xn; R20/22 Xi; R38 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 20/22-38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 612-213-00-1 | isobutilideno-(2-(2-isopropil-4,4-dimetiloxazolidin-3-il)-1,1-dimetiletil)amina | | 419-850-2 | 148348-13-4 | C; R34 R52-53 | C R: 34-52/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61 | | |
| 612-214-00-7 | 4-(2,2-difeniletetil)-N,N-difenilbencenamina | | 421-390-2 | 89114-90-9 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 612-215-00-2 | 3-cloro-2-(isopropiltio)anilina | | 421-700-6 | 179104-32-6 | Xi; R38 N; R51-53 | Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|--|---|--------------------------|---|
| 612-217-00-3 | 1-metoxi-2-propilamina | | 422-550-4 | 37143-54-7 | F; R11 C; R34 Xn; R22 R52-53 | F; C; Xn R: 11-22-34-52/53 S: (1/2)-9-26-36/37/39-45-61 | | |
| 613-181-00-1 | 5,5-dimetil-perhidro-pirimidin-2-ona α -(4-trifluorometilstiril)- α -(4-trifluorometil)cinamilidenedihidrazona | | 405-090-9 | 67485-29-4 | T; R48/25 Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53 | T; N R: 22-36-48/25-50/53 S: (1/2)-22-26-36/37-45-60-61 | | |
| 613-182-00-7 | cloruro de 1-(1-naftilmetil)quinolinio | | 406-220-7 | 65322-65-8 | Carc.Cat.3; R40 Muta.Cat.3; R68 Xn; R22 Xi; R38-41 R 52-53 | Xn R: 22-38-40-41-52/53-68 S: (2)-22-26-36/37/39-61 | | |
| 613-183-00-2 | Mezcla de: 5-(N-metilperfluorooctilsulfonamido)metil-3-octadecil-1,3-oxazolidin-2-ona 5-(N-metilperfluoroheptilsulfonamido)metil-3-octadecil-1,3-oxazolidin-2-ona | | 413-640-4 | - | Xn; R48/22 N; R50-53 | Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2)-36-60-61 | | |
| 613-184-00-8 | 2-etilhexanoato de nitrilotrietenamoniopropan-2-ol | | 413-670-8 | - | Xi; R36 R 43 | Xi R: 36-43 S: (2)-24-26-37 | | |
| 613-185-00-3 | 2,3,5,6-tetrahidro-2-metil-2H-ciclopenta[d]-1,2-tiazol-3-on | | 407-630-9 | 82633-79-2 | T; R25 Xi; R41 R 43 N; R50-53 | T; N R: 25-41-43-50/53 S: (1/2)-22-26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 613-186-00-9 | acetato de (2R,3R)-3-((R)-1-terc-butildimetilsiloxi)etil)-4-oxoazetidín-2-ilo | | 408-050-9 | 76855-69-1 | Xi; R36 R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 36-43-51/53 S: (2)-24-26-37-61 | | |
| 613-188-00-X | 1-(3-(4-fluorofenoxi)propil)-3-metoxi-4-piperidinona | | 411-500-7 | 116256-11-2 | Xn; R22 Xi; R41 R 43 N; R51-53 | Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2)-22-24-26-37/39-61 | | |
| 613-189-00-5 | 1,4,7,10-tetraquis(p-toluensulfonil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano | | 414-030-0 | 52667-88-6 | R 43 N; R50-53 | Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61 | | |
| 613-190-00-0 | 1-amino-4-(2-(5-cloro-6-fluoropirimidin-4-ilamino-metil)-4-metil-6-sulfo-fenilamino)-9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-2-sulfonato de sodio | | 414-040-5 | 149530-93-8 | Xn; R22 R 43 | Xn R: 22-43 S: (2)-22-24-37 | | |
| 613-191-00-6 | 3-etil-2-metil-2-(3-metilbutil)-1,3-oxazolidina | | 421-150-7 | 143860-04-2 | Repr.Cat.2; R60 C; R34 N; R50-53 | T; N R: 60-34-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 613-193-00-7 | heptalactato de pentaquis[3-(dimetilammonio)propilsulfamoil]-[(6-hidroxi-4,4,8,8-tetrametil-4,8-diazoniaundecano-1,11-diildisulfamoil)di[ftalocianinacobre(II)]] | | 414-930-3 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 613-194-00-2 | ácido 6,13-dicloro-3,10-bis[2-[4-fluoro-6-(2-sulfofenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]propilamino]benzo[5,6][1,4]oxazino[2,3-b]fenoxazina-4,11-disulfónico, sal de litio y sodio | | 418-000-8 | 163062-28-0 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2)-22-26-39 | | |
| 613-195-00-8 | 2,2-(1,4-fenileno)bis((4H-3,1-benzoxazin-4-ona) | | 418-280-1 | 18600-59-4 | R 43 R 53 | Xi R: 43-53 S: (2)-24-37-61 | | |
| 613-196-00-3 | ácido 5-[[4-cloro-6-[[2-[[4-fluoro-6-[[5-hidroxi-6-[[4-metoxi-2-sulfofenil]azo]-7-sulfo-2-naftalenil]amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-1-metiletil]amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-3-[[4-(etenilsulfonil)fenil]azo]-4-hidroxi-naftaleno-2,7-disulfónico, sal de sodio | | 418-380-5 | 168113-78-8 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2)-26-39 | | |
| 613-197-00-9 | Mezcla de: 2,4,6-tri(butilcarbamoil)-1,3,5-triazina 2,4,6-tri(metilcarbamoil)-1,3,5-triazina [(2-butil-4,6-dimetil)tricarbamoil]-1,3,5-triazina [(2,4-dibutil-6-metil)tricarbamoil]-1,3,5-triazina | | 420-390-1 | 187547-46-2 | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|------------------------|--|---|--|--|---|
| 613-199-00-X | Mezcla de: 1,3,5-tris(3-aminometilfenil)-1,3,5-(1H,3H,5H)-triazina-2,4,6-triona Mezcla de oligómeros de 3,5-bis(3-aminometilfenil)-1-poli[3,5-bis(3-aminometilfenil)-2,4,6-trioxo-1,3,5-(1H,3H,5H)-triazin-1-il]-1,3,5-(1H,3H,5H)-triazina-2,4,6-triona | | 421-550-1 | - | Carc.Cat.2; R45 Repr.Cat.2; R61 R 43 R 52-53 | T R: 45-61-43-52/53 S: 53-45-61 | | |
| 613-200-00-3 | Producto de la reacción de cobre, (29H,31H-ftalocianinato(2-)-N29,N30,N31,N32)-, ácido clorosulfúrico y 3-(2-sulfooxietilsulfonil)anilina, sales de sodio | | 420-980-7 | - | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)22-26-39 | | |
| 613-201-00-9 | (R)-5-bromo-3-(1-metil-2-pirrolidinilmetil)-1H-indol | | 422-390-5 | 143322-57-0 | Repr.Cat.3; R62 T; R39-48/25 Xn; R20/22 Xi; R41 R 43 N; R50-53 | T; N R: 20/22-39-41-43-48/25-62-50/53 S: (1/2-)53-45-60-61 | | |
| 613-202-00-4 | pimetrozina (ISO) (E)-6-metil-4-[(piridin-3-ilmetileno)amino]-4,5-dihidro-2H[1,2,4]triazin-3-ona(E)-4,5-dihidro-6-metil-4-[(3-piridilmetileno)amino]-1,2,4-triacin-3(2H)-ona | | - | 123312-89-0 | Carc.Cat3; R40 R52-53 | Xn R: 40-52/53 S: (2-)36/37-61 | | |
| 613-203-00-X | piraflufo de etilo [1] piraflufo [2] | | - [1] - [2] | 129630-19-9 [1] 129630-17-7 [2] | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 613-204-00-5 | oxadiargil (ISO) 3-[2,4-dicloro-5-(2-propinilo)fenil]-5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona 5-terc-butil-3-[2,4-dicloro-5-(prop-2-inilo)fenil]-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona | | 254-637-6 | 39807-15-3 | Repr.Cat3; R63 Xn; R48/22 N; R50-53 | Xn; N R: 48/22-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | | |
| 613-205-00-0 | propiconazol (+)-1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-triazol | | 262-104-4 | 60207-90-1 | Xn; R22 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61 | | |
| 613-206-00-6 | fenamidona (ISO) (S)-5-metil-2-metil-5-fenil-3-fenilamino-3,5-dihidroimidazol-4-ona | | - | 161326-34-7 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 613-207-00-1 | sulfato de imazail, solución acuosa hidrogenosulfato de 1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)-1H-imidazol-2-ilo]hidrogenosulfato de (±)-1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)-1H-imidazol-2-ilo] | | 261-351-5 281-291-3 | 58594-72-2 83918-57-4 | Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 22-34-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-45-60-61 | C > 50 %: C, Xn, N; R22-34-43-50-53 30 % < C ≤ 50 %: Xn, N; R22-38-41-43-50-53 25 % ≤ C ≤ 30 %: Xn, N; R22-41-43-50-53 15 % < C < 25 %: Xi, N; R41-43-51-53 5 % ≤ C ≤ 15 %: Xi, N; R36-43-51-53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52-53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52-53 | |
| 613-208-00-7 | imazamox | | - | 114311-32-9 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 613-209-00-2 | clorhidrato de cis-1-(3-cloropropil)-2,6-dimetilpiperidina | | 417-430-3 | 63645-17-0 | T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R51-53 | T; N R: 25-43-48/22-51/53 S: (1/2-)22-36/37-45-61 | | |
| 613-210-00-8 | 2-(3-cloropropil)-2,5,5-trimetil-1,3-dioxano | | 417-650-1 | 88128-57-8 | Xn; R48/22 R52-53 | Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)23-25-36-61 | | |
| 613-211-00-3 | metilsulfato de N-metil-4-(p-formilestiril)piridinio | | 418-240-3 | 74401-04-0 | R43 R52-53 | Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 613-212-00-9 | 4-[4-(2-etil-hexiloxi)fenil](1,4-tiazinano-1,1-dióxido) | | 418-320-8 | 133467-41-1 | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-60-61 | | |
| 613-213-00-4 | cis-1-benzoil-4-[(4-metilsulfonil)oxi]-L-prolina | | 416-040-0 | 120807-02-5 | R 52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|--|---|--------------------------|---|
| 613-214-00-X | N,N-di-n-butil-2-(1,2-dihidro-3-hidroxi-6-isopropil-2-quinolilideno)-1,3-dioxindan-5-carboxamida | | 416-260-7 | 147613-95-4 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 613-215-00-5 | cloruro de 2-clorometil-3,4-dimetoxipiridinio | | 416-440-5 | 72830-09-2 | Xn; R21/22-48/22 Xi; R38-41 R43 N; R51-53 | Xn; N R: 21/22-38-41-43-51/53-48/22 S: (2-)26-36/37/39-61 | | |
| 613-216-00-0 | 6-terc-butil-7-(6-dietilamino-2-metil-3-piridilimino)-3-(3-metilfenil)pirazolo[3,2-c][1,2,4]triazol | | 416-490-8 | - | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 613-217-00-6 | 4-[3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)propionilo]x-1-[2-[3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)propionilo]etil]-2,2,6,6-tetrametilpiperidina | | 416-770-1 | 73754-27-5 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 613-218-00-1 | 6-hidroxi-indol | | 417-020-4 | 2380-86-1 | Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53 | Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 613-219-00-7 | 7a-etil-3,5-bis(1-metiletil)-2,3,4,5-tetrahidrooxazolo[3,4-c]-2,3,4,5-tetrahidrooxazol | | 417-140-7 | 79185-77-6 | Xi; R38 N; R51-53 | Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61 | | |
| 613-220-00-2 | 7,7-dióxido de trans-(4S,6S)-5,6-di-hidro-6-metil-4H-tieno[2,3-b]tiopirano-4-ol | | 417-290-3 | 147086-81-5 | Xn; R22 | Xn R: 22 S: (2-)36 | | |
| 613-221-00-8 | 2-cloro-5-metil-piridina | | 418-050-0 | 18368-64-4 | Xn; R21/22 Xi; R38 R52-53 | Xn R: 21/22-38-52/53 S: (2-)23-25-36/37-61 | | |
| 613-222-00-3 | 4-(1-oxo-2-propenil)-morfolina | | 418-140-1 | 5117-12-4 | Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 | Xn R: 22-41-43-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39 | | |
| 613-223-00-9 | N-isopropil-3-(4-fluorfenil)-1H-indol | | 418-790-4 | 93957-49-4 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 613-224-00-4 | 2,5-dimercaptometil-1,4-ditiano | | 419-770-8 | 136122-15-1 | Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53 | C; N R: 22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 613-225-00-X | Mezcla de: [2-(antraquinon-1-ilamino)-6-[(5-benzoilamino)-antraquinon-1-ilamino]-4-fenil]-1,3,5-triazina 2,6-bis-[(5-benzoilamino)-antraquinon-1-ilamino]-4-fenil-1,3,5-triazina. | | 421-290-9 | - | Xn; R48/22 R53 | Xn R: 48/22-53 S: (2-)22-36-61 | | |
| 613-226-00-5 | dicloruro de 1-(2-(etil(4-(4-(4-(etil(2-piridinoetil)amino)-2-metilfenilazo)benzoilamino)-fenilazo)-3-metilfenil)amino)etilpiridinio | | 420-950-3 | 163831-67-2 | Xi; R41 N; R50-53 | Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 613-227-00-0 | (+/-)-[(R*,R*) y (R*,S*)]-6-fluoro-3,4-di-hidro-2-oxirani-2H-1-benzopirano | | 419-600-2 | - | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-28-36/37-61 | | |
| 613-228-00-6 | (+/-)-(R*,S*)-6-fluoro-3,4-di-hidro-2-oxirani-2H-1-benzopirano | | 419-630-6 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 24-61 | | |
| 613-230-00-7 | florasulam (ISO) 2',6',8'-trifluoro-5-metoxi-5-triazol[1,5-c]pirimidin-2-sulfoanilida | | - | 145701-23-1 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 613-233-00-3 | 4,4'-(oxi-(bismetileno))-bis-1,3-dioxolano | | 423-230-7 | 56552-15-9 | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 614-028-00-1 | Mezcla de: mono-D-glucopiranosida de 2-etilhexilo di-D-glucopiranosida de 2-etilhexilo | | 414-420-0 | - | Xi; R41 | Xi R: 41 S: (2-)26-39 | | |
| 614-029-00-7 | Isómeros constitutivos de penta-O-alil-β-D-fructofuranosil-α-D-glucopiranosido Isómeros constitutivos de hexa-O-alil-β-D-fructofuranosil-α-D-glucopiranosido Isómeros constitutivos de hepta-O-alil-β-D-fructofuranosil-α-D-glucopiranosido | | 419-640-0 | 68784-14-5 | Xn; R22 | Xn R: 22 S: (2-) | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|--|---|-----------|-------------|---|---|--------------------------|---|
| 615-030-00-5 | sales alcalinas, alcalinotérricas y otras sales del ácido tiocianico no mencionadas en este Anexo | A | - | - | Xn; R20/21/22 R32 R52-53 | Xn R: 20/21/22-32-52/53 S: (2-)13-61 | | |
| 615-031-00-0 | sales tálicas del ácido tiocianico | A | 222-571-7 | 3535-84-0 | Xn; R20/21/22 R32 N; R51-53 | Xn; N R: 20/21/22-32-51/53 S: (2-)13-61 | | |
| 615-032-00-6 | sales metálicas de ácido tiocianico no mencionadas en este Anexo | A | - | - | Xn; R20/21/22 R32 N; R50-53 | Xn; N R: 20/21/22-32-50/53 S: (2-)13-60-61 | | |
| 616-092-00-6 | Producto de reacción polimérico de biciclo[2.2.1]hepta-2,5-dieno, eteno, 1,4-hexadieno, 1-propeno con N,N-di-2-propenilformamida | | 404-035-6 | - | R 43 R 53 | Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 616-093-00-1 | Productos de reacción de: condensado de anilina, tereftalaldehído y o-toluidina con anhídrido maléico | | 406-620-1 | 129217-90-9 | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 616-094-00-7 | 3,3'-d ciclohexil-1,1'-metilenobis(4,1-fenileno)diurea | | 406-370-3 | 58890-25-8 | R 43 R 53 | Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 616-095-00-2 | 3,3'-di octadecil-1,1'-metilenobis(4,1-fenileno)diurea | | 406-690-3 | 43136-14-7 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-096-00-8 | N-(3-hexadeciloxi-2-hidroxi-prop-1-il)-N-(2-hidroxi etil)palmitamida | | 408-110-4 | 110483-07-3 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-097-00-3 | N,N'-1,4-fenilenobis(2-((2-metoxi-4-nitrofenil)azo)-3-oxobutanamida | | 411-840-6 | 83372-55-8 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-098-00-9 | 1-[4-cloro-3-((2,2,3,3,3-pentafluoropropoxi)metil)fenil]-5-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida | | 411-750-7 | 119126-15-7 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 616-099-00-4 | 2-[4-[[4-hidroxifenil]sulfonil]fenoxi]-4,4-dimetil-N-[5-[[metilsulfonil]amino]-2-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxi]fenil]-3-oxopentanamida | | 414-170-2 | 135937-20-1 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-100-00-8 | 1,3-dimetil-1,3-bis(trimetilsilil)urea | | 414-180-7 | 10218-17-4 | Xn; R22 Xi; R38 | Xn R: 22-38 S: (2-)36/37 | | |
| 616-101-00-3 | (S)-N-terc-butil-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinacarboxamida | | 414-600-9 | 149182-72-9 | Xn; R22 R 52-53 | Xn R: 22-52/53 S: (2-)61 | | |
| 616-102-00-9 | Mezcla de: α -[3-(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarbonil]- ω -[3-(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarboniloxi]-poli-(oxietileno-co-oxipropileno) 1,2-(o 1,3)-bis[α -(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarbonil]- ω -oxi-poli-(oxietileno-co-oxipropileno)-3-(o 2)-propanol 1,2,3-tris[α -(3-mercaptopropanoxicarbonil-amino)metilfenilaminocarbonil]- ω -oxi-poli-(oxietileno-co-oxipropileno)]propano] | | 415-870-0 | - | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61 | | |
| 616-103-00-4 | (S,S)-trans-4-(acetilamino)-5,6-dihidro-6-metil-7,7-dioxo-4H-tieno[2,3-b]tiopirano-2-sulfonamida | | 415-030-3 | 120298-38-6 | R43 N; R50-53 | Xi; N R:43-50/53 S: 61-(2-)24-37-60-61 | | |
| 616-104-00-X | benalaxil metil N-(2,6-dimetilfenil)-N-(fenilacetil)-DL-alaninato | | 275-728-7 | 71626-11-4 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 616-105-00-5 | clortoluron 3-(3-cloro-p-tolil)-1,1-dimetilurea | | 239-592-2 | 15545-48-9 | Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53 | Xn; N R: 40-63-50/53 S: (2-)36/37-26-46-60-61 | | |
| 616-106-00-0 | fenmedifam (ISO) metil 3-(3-metilcarbaniloiloxi)carbanilato | | 237-199-0 | 13684-63-4 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 616-108-00-1 | iodosulfuron-metil-sodio | | - | 144550-36-7 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|-------------------------------------|---|---|---|
| 616-109-00-7 | sulfosulfuron 1-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-3- 2-etanosulfonilimidazol[(1,2- a)piridin-3-il)sulfonilurea | | - | 141776-32-1 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 616-110-00-2 | ciclanilida ácido 1-[(2,4- diclorofenil)amino]carbonil ciclopropanocarboxílicoácido 1- (2,4- dicloroanilino)carbonil)ciclopropa nocarboxílico | | 419-150-7 | 113136-77-9 | Xn; R22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61 | | |
| 616-111-00-8 | fenhexamida | | 422-530-5 | 126833-17-8 | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 616-112-00-3 | oxasulfuron oxetan-3-il 2-[(4,6- dimetilpirimidin-2-il)- carbamoilsulfamoil]benzoato | | - | 144651-06-9 | Xn; R48/22 N; R50-53 | Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)46-60-61 | | |
| 616-113-00-9 | desmedifam 3-etoxicarbonilaminofenil-N- fenilcarbamoetil 3- fenilcarbamoiloxifenilcarbamato | | 237-198-5 | 13684-56-5 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | C ≥ 2,5 %; N; R50/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; N; R51/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; R52/53 | |
| 616-114-00-4 | dodecanamida, N,N'-(9,9',10,10'- tetra-hidro-9,9',10,10'- tetraoxo(1,1'-biantraceno)-4,4'- diil)bis- | | 418-010-2 | 136897-58-0 | R53 | R: 53 S: 22-61 | | |
| 616-115-00-X | N-(3-acetil-2-hidroxi)fenil)-4-(4- fenilbutoxi)benzamida | | 416-150-9 | 136450-06-1 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-116-00-5 | N-(4-dimetilaminopiridinio)-3- metoxi-4-(1-metil-5-nitroindol-3- ilmetil)-N-(o- tolilsulfonil)benzamidato | | 416-790-9 | - | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-117-00-0 | N-[2-(3-acetil-5-nitrotiofen-2- ilazo)-5- dietilaminofenil]acetamida | | 416-860-9 | - | Repr.Cat.3; R62 R43 N; R50-53 | Xn; N R: 43-62-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61 | | |
| 616-118-00-6 | clorhidrato de N-(2',6'- dimetilfenil)-2- piperidinacarboxamida | | 417-950-0 | 65797-42-4 | Xn; R22 R52-53 | Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61 | | |
| 616-119-00-1 | 2-(1-butil-3,5-dioxo-2-fenil- (1,2,4)-triazolidin-4-il)-4,4- dimetil-3-oxo-N-(2-metoxi-5-(2- (dodecil-1- sulfonil))propionilamino)-fenil)- pentanamida | | 418-060-5 | 118020-93-2 | R 53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-120-00-7 | Mezcla de: N-(3-dimetilamino-4- metilfenil)-benzamida N-(3-dimetilamino-2-metilfenil)- benzamida N-(3-dimetilamino-3-metilfenil)- benzamida | | 420-600-1 | - | Xn; R48/22 N; R51-53 | Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)36/37-61 | | |
| 616-121-00-2 | 2,4-Dihidroxi-N-(2- metoxifenil)benzamida | | 419-090-1 | 129205-19-2 | R 43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 616-123-00-3 | N-[3-[[4-(dietilamino)-2- metilfenil]imino]-6-oxo-1,4- ciclohexadienil]acetamida | | 414-740-0 | 96141-86-5 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 616-124-00-9 | bis(trifluorometilsulfonil)imida de litio | | 415-300-0 | 90076-65-6 | T; R24/25 C; R34 R 52-53 | T R: 24/25-34-52/53 S: (1/2-)22-26- 36/37/39-45-61 | | |
| 616-125-00-4 | 3-ciano-N-(1,1- dimetiletil)androsta-3,5-dieno-17- β-carboxamida | | 415-730-9 | 151338-11-3 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 616-127-00-5 | Una mezcla de: N,N'-Etano-1,2- diilbis(decanamida) 12-Hidroxi-N-[2-[1- oxidecil)amino]etil]octadecanami da N,N'-Etano-1,2-diilbis(12- hidroxioctadecanamida | | 430-050-2 | - | R43 N; R51-53 | Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61 | | |
| 616-128-00-0 | N-(2-(1-alil-4,5-dicianoimidazol- 2-ilazo)-5-(dipropilamino)fenil)- acetamida | | 417-530-7 | 123590-00-1 | R53 | R: 53 S: 61 | | |
| 616-129-00-6 | N,N'-bis(2,2,6,6-tetrametil-4- piperidil)isofetalamida | | 419-710-0 | 42774-15-2 | Xn; R22 Xi; R36 | Xn R: 22-36 S: (2-)22-25-26 | | |
| 616-130-00-1 | N-(3-(2-(4,4-dimetil-2,5-dioxo- imidazolin-1-il)-4,4-dimetil-3- oxo-pentanoilamino)-4-metoxi- fenil)octadecanamida | | 421-780-2 | 150919-56-5 | R53 | R: 53 S: 61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-------------|---|---|--------------------------|---|
| 616-132-00-2 | N-[4-(4-ciano-2-furfurilideno-2,5-dihidro-5-oxo-3-furil)fenil]butano-1-sulfonamida | | 423-250-6 | 130016-98-7 | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 616-133-00-8 | N-ciclohexil-S,S-dioxobenzob[<i>b</i>]tiofeno-2-carboxamida | | 423-990-1 | 149118-66-1 | Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53 | Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-60-61 | | |
| 616-134-00-3 | 3,3'-bis(dioctiloxitiofosfinoiltio)-N,N'-oxibis(metilen)dipropionamida | | 401-820-5 | - | R52-53 | R: 52/53 S: 61 | | |
| 616-135-00-9 | (3 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i>)-2-[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutil]-N-terc-butildecahidroisoquinolina-3-carboxamida | | 430-230-0 | 136522-17-3 | Xn; R22 R52-53 | Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61 | | |
| 616-142-00-7 | 1,3-Bis(vinilsulfonilacetamido)propano | | 428-350-3 | 93629-90-4 | Muta. Cat.3; R68 Xi; R41 R 43 R 52-53 | Xn R: 41-43-68-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61 | | |
| 616-143-00-2 | N,N'-dihexadecil-N,N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamida | | 422-560-9 | 149591-38-8 | Xn; Repr. Cat. 3; R62 Xi; R36 R53 | Xn R: 62-36-53 S: (2-)26-36/37-61 | | |
| 617-018-00-5 | Mezcla de: peróxido de 1-metil-1-(3-(1-metiletil)fenil)etil-1-metil-1-feniletilo, 63% en peso peróxido de 1-metil-1-(4-(1-metiletil)fenil)etil-1-metil-1-feniletilo, 31% en peso | | 410-840-3 | 71566-50-2 | O; R7 N; R51-53 | O; N R: 7-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61 | | |
| 617-019-00-0 | ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico | | 410-850-8 | 128275-31-0 | O; R7 Xi; R41 N; R50 | O; Xi; N R: 7-41-50 S: (2-)3/7-14-26-36/37/39-61 | | |
| 617-020-00-6 | Bis(neodecanoilperóxido) de 1,3-di(prop-2,2-diil)benceno | | 420-060-5 | 117663-11-3 | R10 O; R7 N; R51-53 | O; N R: 7-10-51/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-61 | | |
| 650-042-00-4 | Producto de la reacción de: polietileno-poliamina-alkuil(C16-C18)amidas con fosfonatos de monotio-alkuilo(C2) | | 417-450-2 | - | Xi; R36/38 R43 R52-53 | Xi; N R: 36/38-43-52/53 S: (2-)24-26-37-61 | | |
| 650-043-00-X | Producto de la reacción de: ácido 3,5-bis-tert-butilsalicílico y sulfato de aluminio | | 420-310-3 | - | Xn; R22 N; R50-53 | Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-56-60-61 | | |
| 650-044-00-5 | mezcla de alcoholes lineales y ramificados C14-15 etoxilados, producto de la reacción con epícloridrina | | 420-480-9 | 158570-99-1 | Xi; R38 R43 N; R50-53 | Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 650-045-00-0 | Producto de la reacción de ácido 1,2,3-propanotricarboxílico, 2-hidroxi, éster dietílico, 1-propanol con tetra-n-propanolato de zirconio | | 417-110-3 | - | F; R11 Xi; R38-41 N; R51-53 | F; Xi; N R: 11-38-41-51/53 S: (2-)9-16-26-37/39-61 | | |
| 650-046-00-6 | disulfonato de di(tetrametilamonio)(29H,31H-ftalocianin-N29,N30,N31,N32)disulfonamida, complejo de cuprato(2-), derivados | | 416-180-2 | - | Xn; R22-48/22 N; R51-53 | Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2-)22-36-61 | | |
| 650-047-00-1 | hexafluoroantimoniato de dibencilfenilsulfonio | | 417-760-8 | 134164-24-2 | T; R48/25 Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53 | T; N R: 22-41-43-48/25-51/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61 | | |
| 650-048-00-7 | Producto de la reacción de: bórax, peróxido de hidrógeno, anhídrido acético y ácido acético | | 420-070-1 | - | O; R7 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50 | O; C; N R: 7-20/21/22-35-50 S: (1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-61 | | |
| 650-049-00-2 | hidrógenomaleato de 2-alcoioxietilo, con el grupo alcoilo constituido por 70 a 85% (en masa) de octadecoilo insaturado, 0,5 a 10% de octadecoilo saturado y 2 a 18% de hexadecoilo saturado | | 417-960-5 | - | Xi; R38-41 R43 N; R50-53 | Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61 | | |

| Index No | Denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|-----------|-----------|-------------------------|--|---|---|
| 650-050-00-8 | Mezcla de: 3,5-[1,1-dimetil-4-hidroxidihidrocinnamato de 1-metil-3-hidroxi-3-pirrolidino] y/o 3,5-[1,1-dimetil-4-hidroxidihidrocinnamato de 3-hidroxi-3-pirrolidino] isómeros de bis[3-(3'-(1,1-dimetil-4-hidroxidihidrocinnamato de 1,3-butanodiol isómeros de bis[3-(3',5'-(1,1-dimetil-4-hidroxidihidrocinnamato de 1,3-butanodiol | | 423-600-8 | - | N; R51-53 | N R: 51/53 S: 61 | | |
| 650-055-00-5 | hidrogenofosfato de plata sodio y zirconio | | 422-570-3 | - | N; R50-53 | N R: 50/53 S: 60-61 | | |
| 604-070-00-9 | Triclosan | | 222-182-2 | 3380-34-5 | Xi; R36/38 N; R50-53 | Xi; N R: 36/38-50/53 S: 26-39-46-60-61 | C \geq 20%: Xi, N; R36/38-50/53 0,25% \leq C < 20%: N; R50/53 0,025% \leq C < 0,25%: N; R51/53 0,0025% \leq C < 0,025%: N; R52/53 | |

ANEXO 1D

| Index No | denominación química | Notas explicativas sobre las sustancias | EC No | CAS No | Clasificación | Etiquetado | Límites de concentración | Notas explicativas sobre los preparados |
|--------------|---|---|--------------------------------|--------------------------------|--|--|--------------------------|---|
| 048-002-0-0 | cadmio (estabilizado) [1] óxido de cadmio (estabilizado) [2] | E | 231-152-8 [1] 215-146-2 [2] | 7440-43-9 [1] 1306-19-0 [2] | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 T+; R26 N; R50-53 | T+; N R: 45-26-48/23/25-62-63-68-50/53 S: 53-45-60-61 | | |
| 048-011-00-X | Cadmio (pirofórico) | E | 231-152-8 | 7440-43-9 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 T+; R26 N; R50-53 F; R-17 | T+; N; F R: 45-26-17-48/23/25-62-63-68-50/53 S: 53-45-60-61-43-7/8 | | |
| 609-006-00-3 | 4-nitrotolueno | C | 202-808-0 | 99-99-0 | T; R23/24/25 R33 N; R51/53 | T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-37-45-61 | | |
| 609-065-00-5 | 2-nitrotolueno | E | 201-853-3 | 88-72-2 | Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R22 N; R51-53 | T; N R: 45-46-22-62-51/53 S: 53-45-61 | | |
| 612-039-00-6 | 2-etoxianilina o-fenetidina | C | 202-356-4 | 94-70-2 | T; R23/24/25 R33 | T R: 23/24/25-33 S: (1/2-)28-36/37-45 | | |
| 612-207-00-9 | 4-etoxianilina p-fenetidina | | 205-855-5 | 156-43-4 | Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22 Xi; R36 R43 | Xn R: 20/21/22-36-43-68 S: (2-)36/37-46 | | |

ANEXO 2A

A.21. PROPIEDADES COMBURENTES (LÍQUIDOS)

1. MÉTODO

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método se ha diseñado para medir el potencial de una sustancia líquida de incrementar la velocidad o la intensidad de combustión de una sustancia combustible, o de provocar la inflamabilidad espontánea cuando se mezcla homogéneamente con una sustancia combustible. Se funda en el ensayo de la ONU de líquidos comburentes (1) y ambos son equivalentes. No obstante, dado que el método A.21 se ha diseñado ante todo para cumplir los requisitos establecidos en el Reglamento de sustancias peligrosas, es suficiente efectuar la comparación con una sola sustancia de referencia. Si está previsto emplear los resultados del ensayo para otros fines¹, puede ser necesario realizar el ensayo y la comparación con varias sustancias de referencia.

Si el análisis de la fórmula estructural excluye toda duda razonable de que la sustancia pueda reaccionar exotérmicamente con un material combustible, no será preciso realizar el ensayo.

Antes de llevar a cabo el ensayo, conviene disponer de información preliminar sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia.

Este ensayo no puede realizarse con sólidos, gases, sustancias explosivas o altamente inflamables ni peróxidos orgánicos.

Si ya se dispone de los resultados del ensayo de la ONU de líquidos comburentes (1) para la sustancia en cuestión, no será necesario realizar el presente ensayo.

1.2 DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo medio de aumento de la presión: media de los tiempos medidos para que la presión de la mezcla de ensayo aumente de 690 kPa a 2070 kPa (presión manométrica).

1.3 SUSTANCIA DE REFERENCIA

La sustancia de referencia ha de ser ácido nítrico acuoso (pureza de grado analítico) al 65% (p/p)².

Si el experimentador prevé que los resultados del ensayo pueden emplearse para otros fines¹, cabe realizar el ensayo con otras sustancias de referencia³.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se mezcla el líquido que va a estudiarse en proporción de 1/1, en masa, con celulosa fibrosa y se introduce en un recipiente a presión. Si se produce una combustión espontánea durante la mezcla o la introducción, no es necesario proseguir el ensayo.

En caso contrario, se lleva a cabo el ensayo completo. Se calienta la mezcla en el recipiente a presión y se mide el tiempo medio que tarda la presión en aumentar de 690 kPa a 2070 kPa (presión manométrica). Se compara el resultado con el tiempo medio de aumento de la presión de una mezcla 1/1 de la sustancia o sustancias de referencia y celulosa.

1.5 CRITERIOS DE CALIDAD

En una serie de cinco pruebas con la misma sustancia ningún resultado debe diferir en más del 30 % de la media aritmética. En caso contrario, es preciso descartar los resultados que difieran en más del 30 % de la media aritmética, mejorar la técnica de mezcla e introducción y repetir el ensayo.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1 Preparación

1.6.1.1 Sustancia combustible

Se emplea como material combustible celulosa fibrosa deshidratada, cuyas fibras tengan una longitud comprendida entre 50 y 250 μm y un diámetro medio de 25 μm .⁴ La celulosa se deshidrata hasta peso constante en una capa de espesor máximo de 25 mm a 105 °C durante 4 horas y se conserva en un desecador, con desecante, hasta que se enfríe y vaya a utilizarse. El contenido acuoso de la celulosa deshidratada ha de ser inferior al 0,5% de la masa deshidratada⁵. Si es preciso, se prolonga el tiempo de deshidratación⁶. Debe emplearse el mismo lote de celulosa para todo el ensayo.

¹ Por ejemplo, en el marco de las normas de transporte de la ONU.

² Debe valorarse el ácido antes del ensayo para confirmar su concentración.

³ Por ejemplo, en la referencia bibliográfica 1 se emplean ácido perclórico al 50% (p/p) y clorato de sodio al 40% (p/p).

⁴ Por ejemplo, celulosa en polvo para columna de cromatografía Whatman CF 11, n° de catálogo 4021 050.

⁵ Confirmado, por ejemplo, mediante valoración de Karl-Fisher.

⁶ También puede obtenerse ese contenido acuoso (por ejemplo) calentando la celulosa a 105 °C al vacío durante 24 h.

1.6.1.2 *Equipo*1.6.1.2.1 *Recipiente a presión*

Se necesita un recipiente a presión, formado por un cilindro de acero de 89 mm de largo y 60 mm de diámetro exterior (véase la figura 1). Se practican dos rebajes planos diametralmente opuestos (que reducen esa sección transversal del recipiente a 50 mm) para inmovilizarlo mientras se ajustan la pieza de encendido y la de sujeción del diafragma de seguridad. El recipiente ha de tener una luz de 20 mm, que se ensanchará a ambos extremos del cilindro rebajando las paredes internas en una longitud de 19 mm y se fileteará de manera que pueda alojar una rosca del tipo *British Standard Pipe* (BSP) de 1" o su equivalente métrico. En la superficie convexa del recipiente, a 35 mm de un extremo y a 90° de los rebajes planos, se enrosca un tubo lateral que servirá para medir la presión. El extremo del tubo estará provisto de una rosca de 1/2" BSP (o su equivalente métrico), que se ajustará en una cavidad de 12 mm de profundidad practicada en la pared del recipiente y fileteada debidamente. Si es necesario, se sella con un material inerte para evitar la fuga de gas. El tubo lateral sobresale 55 mm del recipiente a presión y tiene una luz de 6 mm. La cara interna del extremo libre del tubo se rebaja y filetea para que pueda alojar un transductor de presión de tipo diafragmático. Puede emplearse cualquier medidor de presión que no sufra alteraciones debido a los gases calientes ni a los productos de descomposición y que pueda detectar aumentos de presión de 690 a 2070 kPa en menos de 5 ms.

Se cierra el extremo del recipiente más alejado del tubo lateral con una pieza de encendido provista de dos electrodos, uno de ellos aislado del cuerpo de la pieza y el otro unido a masa con éste. El otro extremo del recipiente se obtura con un diafragma de seguridad (presión aproximada de rotura: 2200 kPa), que se mantiene en su lugar mediante una pieza de sujeción que presenta una luz de 20 mm. Si es necesario, se sella la pieza de encendido con material inerte para evitar la fuga de gas. Para mantener el conjunto en la posición correcta durante la utilización, se emplea un soporte de acero suave (figura 2), que suele estar formado por una base de 235 mm x 184 mm x 6 mm y un tubo hueco de sección cuadrada (70 mm x 70 mm x 4 mm) de 185 mm de longitud.

En uno de los extremos del tubo cuadrado se seccionan dos caras opuestas, de manera que se obtenga un tubo de 86 mm de largo prolongado por dos lados planos a modo de patas, que se cortan para que, una vez soldado a la base, el tubo forme un ángulo de 60° con la horizontal. En el extremo superior de una de las caras del tubo se practica una muesca de 22 mm de ancho y 46 mm de profundidad, de manera que, al colocar el recipiente a presión en el soporte con la pieza de encendido hacia abajo, el tubo lateral para medir la presión quede alojado en ella. En la cara interna de la pared del tubo orientada hacia abajo se suelda una pieza de acero de 30 mm de ancho y 6 mm de grueso para que sirva de separador. En la pared opuesta se hacen dos orificios y se enroscan dos tornillos de palomilla de 7 mm para fijar el recipiente a presión. Para sujetar el recipiente desde abajo, se sueldan dos rebordes de acero de 12 mm de ancho y 6 mm de grueso a los laterales de la parte inferior de la sección cuadrada.

1.6.1.2.2 *Dispositivo de ignición*

El dispositivo de ignición está integrado por un hilo de Ni/Cr de 25 cm de largo y 0,6 mm de sección, con una resistencia de 3,85 ohm/m. El hilo se enrolla en forma de bobina con una varilla de 5 mm de diámetro y se une a los electrodos de la pieza de encendido. La bobina ha de ajustarse a uno de los esquemas de la figura 3. La distancia entre la cara superior de la pieza de encendido y la cara inferior de la bobina de ignición debe ser de 20 mm. Si los electrodos no son regulables, los segmentos de hilo que se encuentran entre la bobina y la cara superior de la pieza de encendido deben aislarse con un revestimiento cerámico. El hilo se calienta mediante una alimentación eléctrica estable que proporcione una intensidad de 10 A como mínimo.

1.6.2 **Realización del ensayo⁷**

Se coloca en el soporte el recipiente montado con el transductor de presión y el dispositivo de ignición, pero sin el diafragma de seguridad, con la pieza de encendido hacia abajo. Se introducen 2,5 g del líquido que vaya a someterse a ensayo y 2,5 g de celulosa deshidratada en una copa de vidrio y se mezclan con un agitador de cristal⁸. Por motivos de seguridad, la persona que realice la mezcla debe interponer una pantalla protectora. Si se produce una combustión espontánea durante la mezcla o la introducción, no es necesario proseguir el ensayo. Se introduce la mezcla en pequeñas cantidades en el recipiente a presión dando ligeros golpecitos y se comprueba que la mezcla rodea bien y está en contacto con la bobina de ignición sin dejar hueco. La bobina no debe deformarse durante este proceso, pues ello podría falsear los resultados⁹. Se coloca en su lugar el diafragma de seguridad y se enrosca al máximo la pieza de sujeción. Se coloca el recipiente cargado en el soporte con el disco de seguridad hacia arriba y se introduce el conjunto en una campana extractora blindada o una cámara de fuego. Se conectan los bornes externos de la pieza de encendido a una alimentación eléctrica y se aplica una corriente de 10 A. No deben transcurrir más de 10 minutos entre el inicio de la preparación de la mezcla y el momento en que se aplica la corriente.

La señal emitida por el transductor de presión se recoge en un sistema que permita el registro continuo de la curva presión/tiempo y su análisis (por ejemplo, un registrador de señales transitorias acoplado a un registrador sobre cinta de papel). Se calienta la mezcla hasta que se rompa el diafragma de seguridad o durante un tiempo mínimo de 60 s. Si no se ha roto el diafragma, debe esperarse a que la mezcla se enfríe antes de abrir el recipiente con prudencia y tomando las debidas precauciones por si estuviera aún a presión. Se realizan cinco ensayos con la mezcla y con la sustancia o sustancias de referencia. Se registra el tiempo que tarda la presión en aumentar de 690 kPa a 2070 kPa (presión manométrica). Se calcula la media de los tiempos registrados.

En algunos casos, las sustancias pueden generar un aumento de presión (demasiado elevado o demasiado escaso) debido a reacciones químicas que no son características de las propiedades comburentes de dichas sustancias. Puede entonces ser necesario repetir el ensayo sustituyendo la celulosa por un material inerte, como la diatomita (kieselguhr), para cerciorarse de que no se trata de un efecto no comburente.

⁷ Las mezclas de sustancias comburentes y celulosa deben tratarse como potencialmente explosivas y manipularse con las debidas precauciones.

⁸ En la práctica, puede prepararse una mezcla 1/1 de líquido problema y celulosa en cantidad superior a la necesaria para el ensayo, tomar $5 \pm 0,1$ g e introducirlos en el recipiente a presión. La mezcla debe prepararse justo antes de cada ensayo.

⁹ Debe evitarse sobre todo que entren en contacto las circunvoluciones adyacentes de la bobina.

2 RESULTADOS

Tiempos de aumento de la presión con la sustancia de ensayo y con la sustancia o sustancias de referencia.
Tiempos de aumento de la presión con una sustancia inerte, si procede.

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se calcula el tiempo medio de aumento de la presión con la sustancia de ensayo y con la sustancia o sustancias de referencia.
Se calcula el tiempo medio de aumento de la presión con una sustancia inerte, si procede.

El cuadro 1 recoge algunos ejemplos de resultados.

Cuadro 1
Ejemplos de resultados ^{d)}

| Sustancia ^{e)} | Tiempo medio de aumento de la presión con una mezcla de 1/1 de celulosa (ms) |
|---|--|
| Ácido nítrico, 65 % | 4767 ^{a)} |
| Ácido perclórico, 50 % | 121 ^{a)} |
| Ácido perclórico, 55 % | 59 |
| Bicromato de amonio, en solución acuosa saturada | 20800 |
| Clorato de sodio, en solución acuosa al 40 % | 2555 ^{a)} |
| Nitrato de calcio, en solución acuosa saturada | 6700 |
| Nitrato férrico, en solución acuosa saturada | 4133 |
| Nitrato de níquel, en solución acuosa saturada | 6250 |
| Nitrato de plata, en solución acuosa saturada | - ^{b)} |
| Nitrato de potasio, en solución acuosa al 30 % | 26690 |
| Nitrato de sodio, en solución acuosa al 45 % | 4133 |
| Perclorato de litio, en solución acuosa saturada | 1686 |
| Perclorato de magnesio, en solución acuosa saturada | 777 |
| <i>Sustancia inerte</i> | |
| Agua/celulosa | - ^{b)} |

a) Valor medio de ensayos interlaboratorios comparados

b) No se alcanza la presión máxima de 2070 kPa

c) Las soluciones saturadas deben prepararse a 20 °C

d) Véase la referencia bibliográfica (1) para la clasificación según el régimen de transporte de la ONU

3 INFORME

3.1 INFORME DEL ENSAYO

En el informe del ensayo debe figurar la información siguiente:

- identidad, composición, pureza, etc. de la sustancia de ensayo;
- concentración de la sustancia de ensayo;
- procedimiento empleado para deshidratar la celulosa;
- contenido acuoso de la celulosa empleada;
- resultados de las mediciones;
- resultados de los ensayos con la sustancia inerte, si procede;
- tiempos medios calculados de aumento de la presión;
- cualquier desviación respecto al presente método y justificación correspondiente;
- cualquier información u observación complementaria importante para interpretar los resultados;

3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS¹⁰

La evaluación de los resultados del ensayo se fundará en los siguientes criterios:

- a) la mezcla de sustancia de ensayo y celulosa se inflama espontáneamente o no;
- b) la comparación del tiempo medio de aumento de la presión de 690 kPa a 2070 kPa con el tiempo medio correspondiente a la sustancia o sustancias de referencia.

¹⁰ Véase la referencia bibliográfica 1 para la interpretación de los resultados conforme a las normas de transporte de la ONU en caso de que se utilicen varias sustancias de referencia.

Se considerará que una sustancia líquida es comburente si:

- una mezcla de 1/1 en masa de dicha sustancia y celulosa se inflama espontáneamente o
- el tiempo medio de aumento de la presión de una mezcla de 1/1 en masa de dicha sustancia y celulosa es inferior o igual al tiempo medio de una mezcla de 1/1 en masa de ácido nítrico acuoso al 65% (p/p) y celulosa.

Con el fin de evitar falsos positivos, a la hora de interpretar los resultados deben tomarse en consideración los resultados del ensayo con la sustancia y un material inerte.

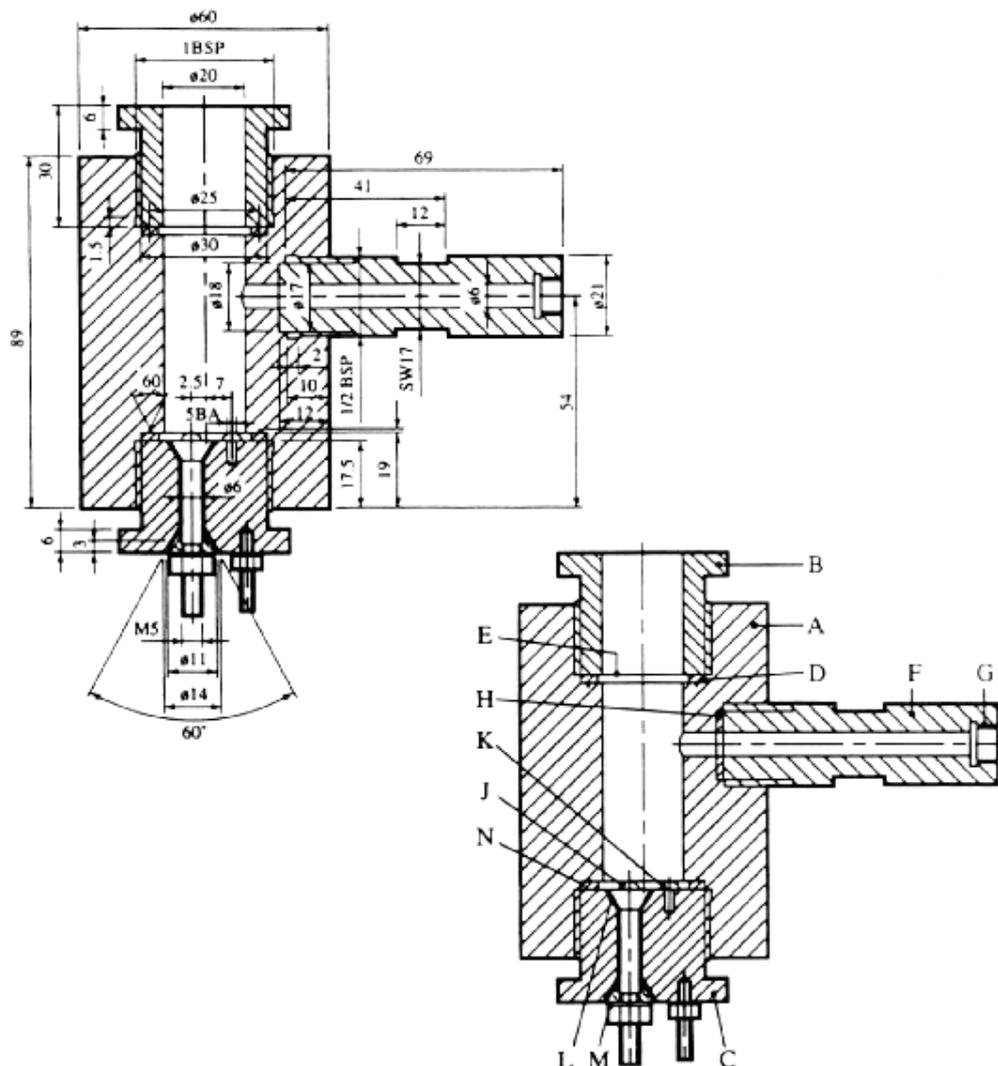
4

BIBLIOGRAFÍA

- Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3ª edición revisada. Publicación de la ONU nº ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Figura 1

Recipiente a presión



- | | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------|
| (A) Cuerpo del recipiente a presión | (B) Sujeción del diafragma de seguridad | (C) Pieza de encendido |
| (D) Junta de plomo blando | (E) Diafragma de seguridad | (F) Tubo-toma de presión |
| (G) Rosca para transductor de presión | (H) Junta | (J) Electrodo aislado |
| (K) Electrodo unido a masa | (L) Aislamiento | (M) Cono de acero |
| (N) Ranura de deformación de la junta | | |

Figura 2

Soporte

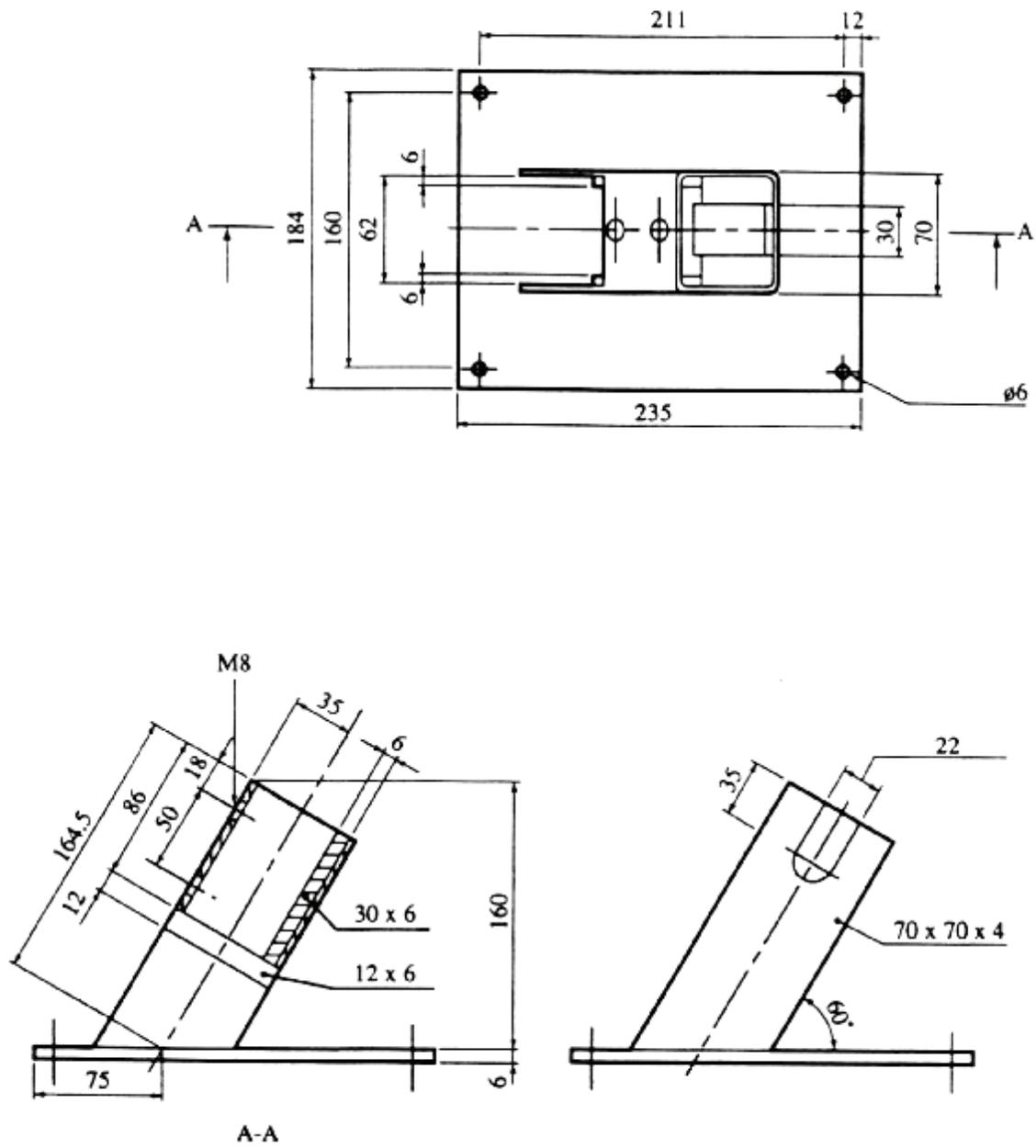
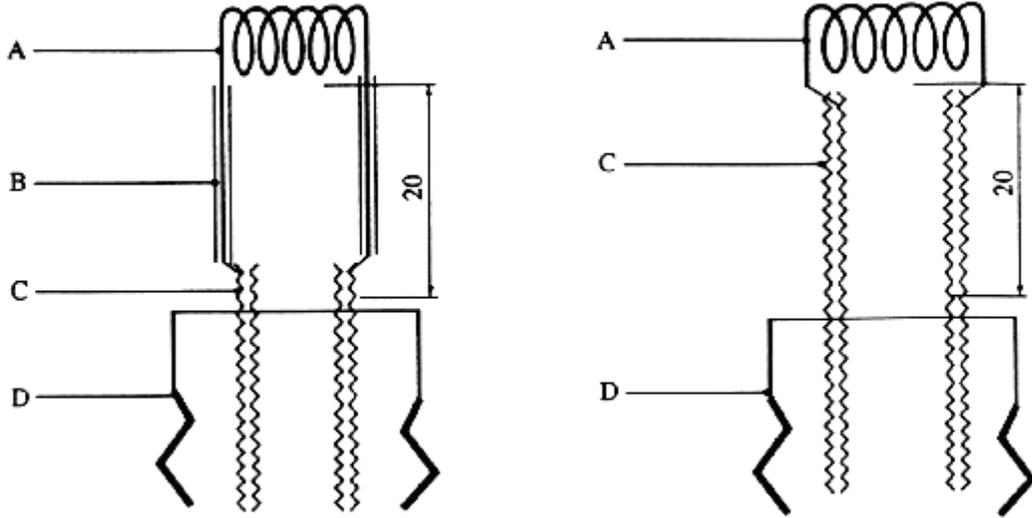


Figura 3

Dispositivo de ignición



(A) Bobina de ignición

(B) Aislamiento

(C) Electrodo

(D) Pieza de encendido

Nota: cualquiera de estas dos configuraciones puede ser utilizada.

ANEXO 2B

B.1 BIS. TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE DOSIS FIJAS

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 420 (2001).

1.1 INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales para evaluar la toxicidad aguda utilizan la muerte de los animales como parámetro. En 1984 la British Toxicology Society propuso un nuevo enfoque de los ensayos de toxicidad aguda basado en la administración de una serie de dosis fijas (1) Este enfoque evitaba recurrir a la muerte de los animales como parámetro y se basaba, en cambio, en la observación de signos claros de toxicidad a un nivel determinado de una serie de dosis fijas. Tras una serie de estudios de validación *in vivo* británicos (2) e internacionales (3), este procedimiento fue adoptado como método de ensayo en 1992. Posteriormente, se han evaluado las propiedades estadísticas del método de dosis fijas utilizando modelos matemáticos en una serie de estudios (4) (5) (6). Conjuntamente, los estudios *in vivo* y los basados en modelos han demostrado que el procedimiento es reproducible, requiere menos animales y causa menos sufrimiento que los métodos tradicionales. Al mismo tiempo, permite clasificar las sustancias de manera parecida a los otros métodos de ensayo de toxicidad aguda.

En el *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (7) se dan directrices sobre la selección del método de ensayo más adecuado en función del objetivo. Además, en este documento orientativo se facilita información complementaria sobre la realización e interpretación del método de ensayo B.1 bis.

Es un principio del método que en el estudio principal sólo se empleen dosis moderadamente tóxicas y que se evite la administración de dosis que se prevean letales. Asimismo, no es necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados por sus efectos corrosivos o muy irritantes. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo serán sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En otro documento orientativo (8) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

El método aporta información sobre las propiedades peligrosas y permite clasificar las sustancias de acuerdo con el Sistema Armonizado Mundial (SAM) (Globally Harmonised System (GHS)) de clasificación de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (9)

El laboratorio que haga los ensayos debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia estudiada antes de llevar a cabo la prueba. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo*, los datos toxicológicos sobre otras sustancias estructuralmente relacionadas, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los afectados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana y ayuda a la selección de una dosis inicial adecuada.

1.2 DEFINICIONES

Toxicidad oral aguda: efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas dentro de un período de 24 horas.

Muerte retardada significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el período de observación de 14 días.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. La dosis se expresa en peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal sometido al experimento (por ejemplo, mg/kg).

Toxicidad manifiesta es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de una sustancia (véanse ejemplos en (3)). de tal manera que a la dosis fija inmediatamente superior pueden preverse en la mayoría de los animales dolores fuertes y signos continuados de sufrimiento grave, agonía (véanse los criterios al respecto en *Humane Endpoints Guidance Document* (8)) o muerte probable.

SAM: Sistema Armonizado Mundial (*Globally Harmonised System* (GHS)) de clasificación y etiquetado de productos químicos. Actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), el Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas (propiedades fisico-químicas) y la OIT (comunicación de peligros), coordinada por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de Sustancias Químicas (IOMC, en sus siglas inglesas).

Muerte inminente: fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación previsto. Entre los signos que indican esta situación en los roedores cabe citar: convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. (Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información).

DL₅₀ (dosis letal mediana): dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. El valor de la DL₅₀ se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (mg/kg).

Dosis límite: dosis del límite máximo del ensayo (2 000 o 5 000 mg/kg).

Agonía: situación en la que el animal se está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento. (Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información).

Muerte previsible: presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua. (Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información).

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administran de manera gradual a grupos de animales de un solo sexo dosis fijas de 5, 50, 300 y 2.000 mg/kg (excepcionalmente podría considerarse una dosis adicional de 5 000 mg/kg, véase la sección 1.6.2). La dosis inicial se determina basándose en un estudio preliminar y consiste en la que se prevé que produzca ciertos signos de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves ni mortalidad. En un documento orientativo aparte de la OCDE (8) se describen de manera detallada las afecciones y los signos clínicos que denotan dolor, sufrimiento y muerte inminente. Pueden darse dosis más altas o más bajas a otros grupos de animales según la presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad. Este procedimiento continúa hasta que se determina la dosis que causa toxicidad manifiesta o sólo una muerte o cuando no se observan efectos a la dosis más alta o cuando ocurren muertes a la dosis más baja.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Selección de la especie animal

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se emplean hembras (7). Se hace así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de DL_{50} muestra que normalmente hay poca diferencia en cuanto a sensibilidad entre los sexos, pero, en los casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles (10). Sin embargo, si se conocen propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que es probable que los machos sean más sensibles, deberá utilizarse este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente.

Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El animal, al inicio de la administración de la sustancia, debe tener entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo del $\pm 20\%$ del peso medio de los animales a los que previamente se haya administrado la sustancia.

1.4.2 Alojamiento y alimentación

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Aunque la humedad relativa debe ser como mínimo del 30% y preferiblemente no superior al 70%, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede darse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

1.4.3 Preparación de los animales

Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar la administración de la sustancia, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

1.4.4 Preparación de las dosis

En general, las sustancias estudiadas deben administrarse en un volumen constante para toda la gama de dosis que deban ensayarse, variando la concentración del preparado administrado. Sin embargo, cuando deba administrarse una mezcla o producto final líquidos, puede resultar más adecuado para la posterior evaluación de riesgos utilizar la sustancia no diluida, es decir, a una concentración constante. Algunas autoridades reguladoras establecen este criterio con carácter obligatorio. En cualquiera de los dos casos, no debe superarse el volumen de dosis máximo. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. En los roedores, el volumen no debe sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, de las que se pueden usar 2 ml/100 g de peso corporal. En cuanto a la formulación del preparado que se administre, se recomienda el uso de una solución/suspensión/emulsión acuosa siempre que sea posible, seguida, en orden de preferencia, por una solución/suspensión/emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca la estabilidad del preparado durante el período en que se vaya a utilizar y conste que ésta sea aceptable.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 Administración de las dosis

La sustancia estudiada se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o cánula adecuada de intubación. Cuando se dé el caso, poco habitual, de que no pueda administrarse una dosis única, se podrá dividir ésta en partes más pequeñas durante un período que no sobrepase las 24 horas.

Los animales se mantendrán en ayunas antes de la administración de la dosis (por ejemplo, las ratas no deberán recibir alimento alguno durante la noche, pero sí agua). los ratones no deberán ser alimentados durante 3-4 horas, pero podrán beber agua). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada ésta, podrá continuarse el ayuno durante unas 3

ó 4 horas en el caso de las ratas y 1 ó 2 horas cuando se trate de ratones. Cuando una dosis se administre en fracciones a lo largo de un período, podrá ser necesario proporcionar a los animales alimento y agua, en función de la duración del período.

1.5.2 Estudio preliminar

La finalidad del estudio preliminar es determinar la dosis inicial adecuada para el estudio principal. La sustancia estudiada se administra a cada animal de manera secuencial según lo indicado en los gráficos del anexo 1. El estudio preliminar se considera terminado cuando puede tomarse una decisión sobre la dosis inicial para el estudio principal (o si se observa una muerte a la dosis fija más baja)

La dosis inicial para el estudio preliminar se selecciona a partir de los niveles de dosis fija de 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg y consiste en la dosis que se prevé que produzca toxicidad manifiesta, basándose, cuando sea posible, en datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* referentes a la misma sustancia química y a otras sustancias estructuralmente relacionadas. A falta de esta información, la dosis inicial será de 300 mg/kg.

Se dejará transcurrir un plazo mínimo de 24 horas entre las administraciones de dosis a cada animal. El período de observación de todos los animales debe ser de, al menos, 14 días.

Excepcionalmente, y sólo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otra dosis fija superior de 5 000 mg/kg (véase el anexo 3). Por razones de bienestar animal, se desaconseja el ensayo de sustancias de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (DL₅₀ entre 2 000-5 000 mg/kg) con animales. Este ensayo sólo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal o del medio ambiente.

En los casos en que se ensaye en un animal la dosis fija más baja (5 mg/kg) en un estudio preliminar y el animal muera, el procedimiento normal es poner fin al estudio y asignar la sustancia a la categoría 1 del SAM (tal como se indica en el anexo 1). Sin embargo, si se requiere confirmar la clasificación, puede seguirse un procedimiento opcional complementario, que se indica a continuación. Se administra a otro animal una dosis de 5 mg/kg. Si éste muere, queda confirmada la categoría 1 del SAM y se pone fin al estudio inmediatamente. Si el segundo animal sobrevive, se administra una dosis de 5 mg/kg a otros tres animales. Dado que habrá un riesgo elevado de mortalidad, los animales recibirán la dosis de manera secuencial para proteger el bienestar animal. El intervalo entre la administración de la dosis a cada animal debe ser suficiente para que quede claro que el animal anterior tiene probabilidades de sobrevivir. Si ocurre una segunda muerte, se pondrá fin inmediatamente a la administración de dosis, y no se dará la sustancia a ningún otro animal. Dado que el hecho de que se produzca una segunda muerte (independientemente del número de animales sometidos a ensayo en el momento de la terminación) corresponde al resultado A (2 o más muertes), se seguirá la norma de clasificación del anexo 2 a la dosis fija 5 mg/kg (categoría 1 si hay dos o más muertes o categoría 2 si sólo hay una muerte). Además, el anexo 4 da orientaciones sobre la clasificación en el sistema comunitario hasta que se aplique el nuevo SAM.

1.5.3 Estudio principal

1.5.3.1 Número de animales y dosis

La actuación que debe seguirse tras el ensayo al nivel de dosis inicial se indica en los gráficos del anexo 2. Deberá optarse por una de las tres actuaciones siguientes: terminar el ensayo y asignar a la sustancia la categoría de peligro adecuada, ensayar a una dosis fija superior o ensayar a una dosis fija inferior. Sin embargo, para proteger a los animales, no se repetirá en el estudio principal ningún nivel de dosis que haya causado un resultado de muerte en el estudio preliminar (véase el anexo 2). La experiencia ha mostrado que el resultado más probable al nivel de dosis inicial es que pueda clasificarse la sustancia y que no sean necesarios más ensayos.

Para cada nivel de dosis investigado se utilizará normalmente un total de cinco animales de un mismo sexo. Este grupo de cinco animales estará compuesto de un animal del estudio preliminar al que se haya administrado la sustancia al nivel de dosis seleccionado más otros cuatro (excepto cuando un nivel de dosis utilizado en el estudio principal no estuviera incluido en el estudio preliminar, situación que es poco frecuente).

El intervalo de tiempo entre la administración de dosis a cada nivel se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de animales con la dosis siguiente no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados. Se recomienda, si es necesario, un período de tres o cuatro días entre la administración de cada nivel de dosis para poder observar la toxicidad retardada. Este intervalo puede ajustarse según convenga, por ejemplo en caso de respuestas no concluyentes.

Cuando se emplee una dosis fija superior de 5 000 mg/kg, se seguirá el procedimiento indicado en el anexo 3 (véase también la sección 1.6.2).

1.5.3.2 Ensayo límite

El ensayo límite se utiliza principalmente en situaciones en las que el experimentador tiene información de que la sustancia estudiada es probable que no sea tóxica, es decir, sólo resulta tóxica por encima de las dosis límite reglamentarias. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos, mezclas o productos ensayados semejantes, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en la que se prevé que ésta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

Utilizando el procedimiento normal, una dosis inicial en el estudio preliminar de 2 000 mg/kg (o excepcionalmente 5 000 mg/kg) seguida por la administración de este nivel de dosis a cuatro animales sirve de ensayo límite para las presentes directrices.

1.6 OBSERVACIONES

Tras la administración de la dosis, se observan los animales uno por uno, al menos una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención durante las primeras 4 horas, y a continuación diariamente, a lo largo de un total de

14 días, excepto cuando tengan que eliminarse del estudio y sacrificarse de manera compasiva por razones de bienestar animal o bien cuando resulten muertos. Sin embargo, no debe fijarse rígidamente la duración de la observación, sino que ésta debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos (11). Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en una ficha de cada animal.

Será necesario proceder a observaciones adicionales si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad locomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso o signos continuos de sufrimiento intenso deberán sacrificarse de forma compasiva. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

1.6.1 **Peso corporal**

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

1.6.2 **Patología**

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

2 **RESULTADOS**

Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, se reunirán todos los resultados en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la necropsia.

3 **INFORME**

3.1 **Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Sustancia estudiada:

- naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización);
- identificación química, incluido el número CAS.

Vehículo (si procede):

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

- especie y cepa utilizadas;
- situación microbiológica de los animales, cuando se conozca;
- número, edad y sexo de los animales (incluida, cuando proceda, una justificación del uso de machos en vez de hembras);
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones de ensayo:

- información sobre la formulación de la sustancia de ensayo, incluida la forma física del material administrado;
- datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración;
- datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluido el origen/tipo de la dieta y el origen del agua);
- justificación de la elección de la dosis inicial.

Resultados:

- tabulación de las respuestas y los niveles de dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluida la mortalidad, naturaleza, gravedad y duración de los efectos);
- tabulación del peso corporal y los cambios en el mismo;
- peso de cada animal el día en que se administre la dosis, posteriormente a intervalos semanales, y en el momento de la muerte o el sacrificio;
- fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio previsto;

- cronología de la aparición de signos de toxicidad e indicación de si éstos son reversibles en cada animal
- observaciones de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

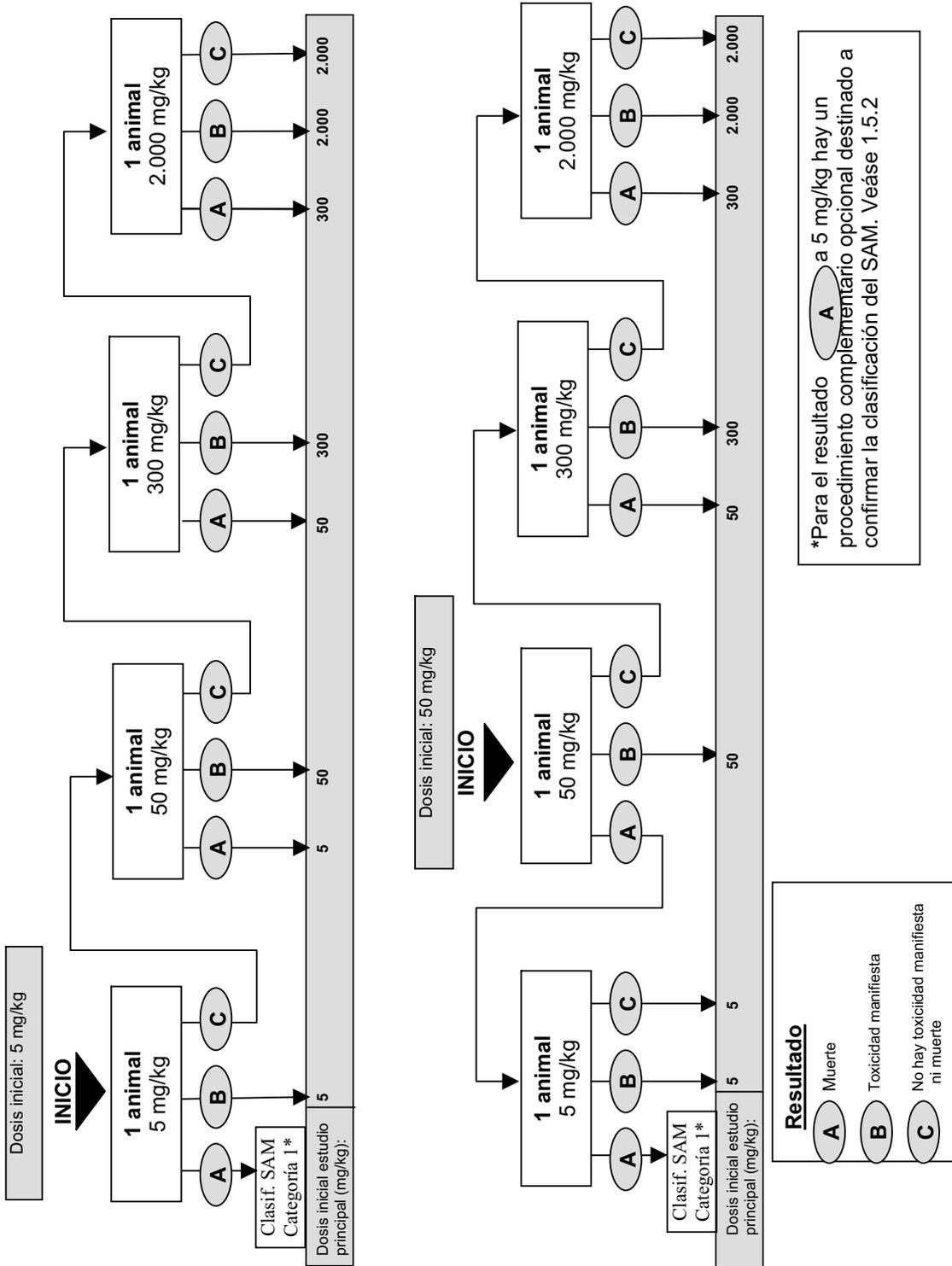
Evaluación e interpretación de los resultados.

Conclusiones.

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469-482 (3).
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.*, 14, 315-323. *Human Exptl. Toxicol.*
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183 -196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.
- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.
- (11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . n: Principles and Methods of Toxicology . 3rd Edition. A.W. Hayes , Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA

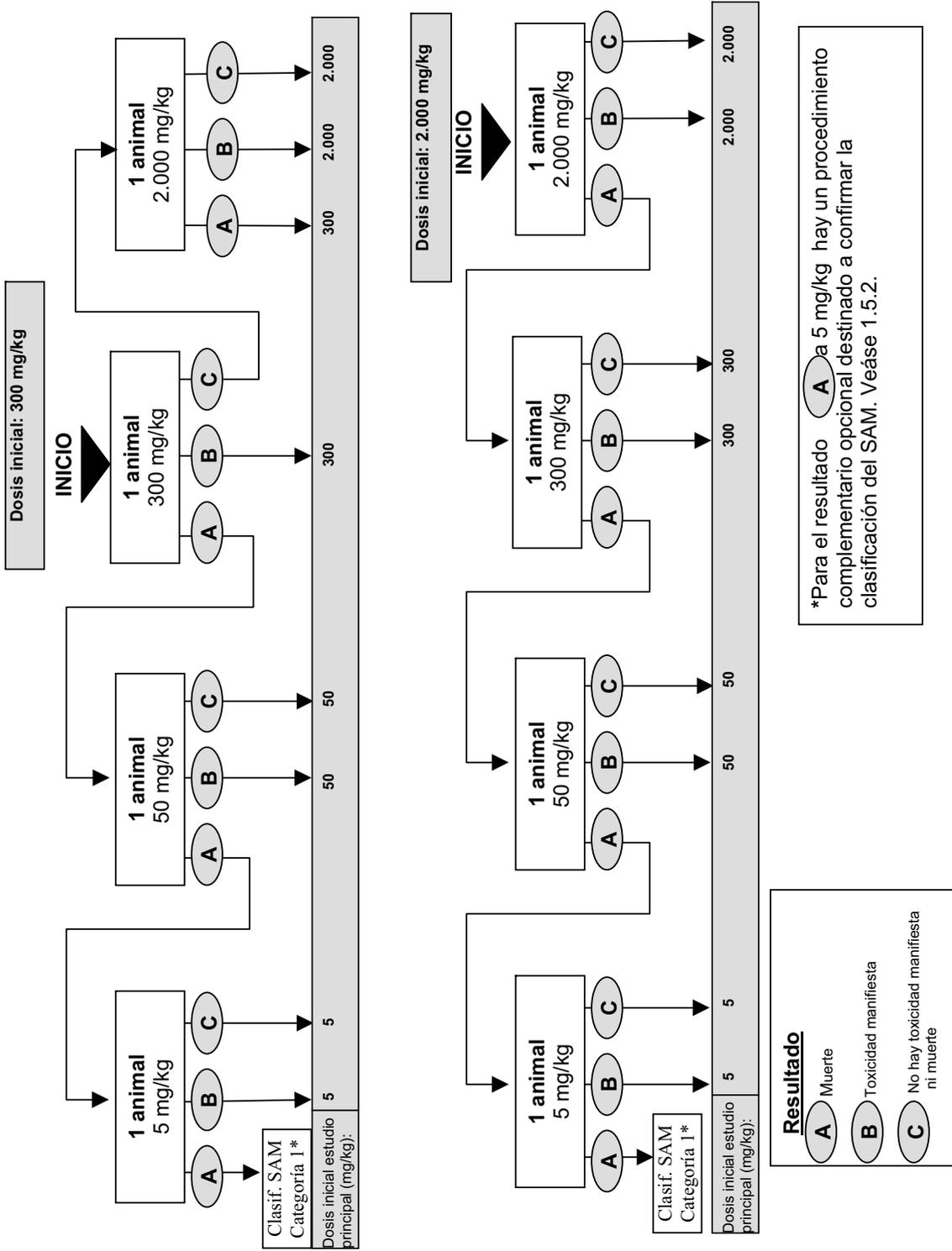
ANEXO 1: DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRELIMINAR



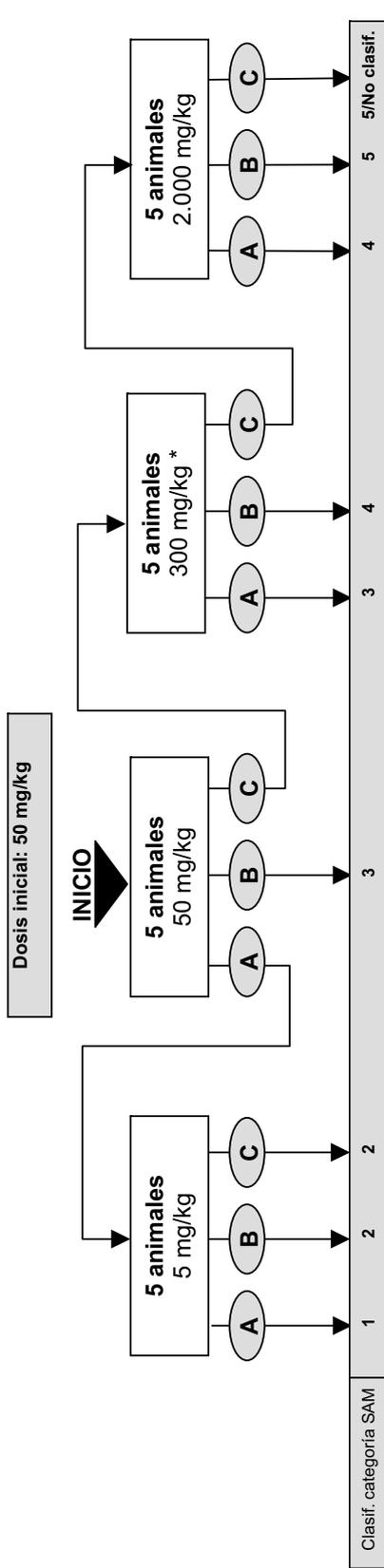
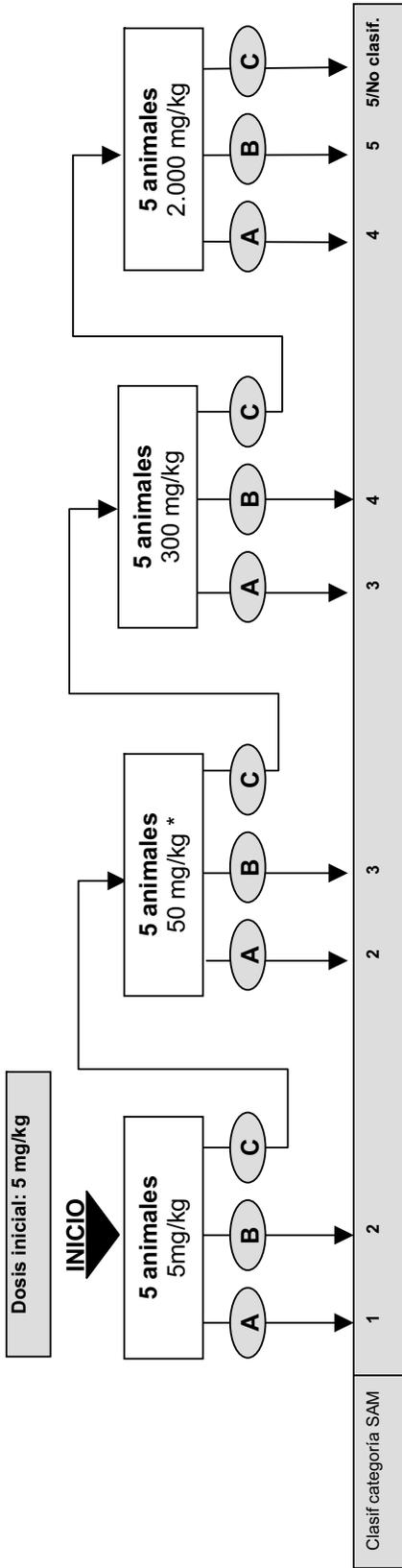
Resultado

- A Muerte
- B Toxicidad manifiesta
- C No hay toxicidad manifiesta ni muerte

*Para el resultado A a 5 mg/kg hay un procedimiento complementario opcional destinado a confirmar la clasificación del SAM. Véase 1.5.2



ANEXO 2: DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRINCIPAL



Resultado

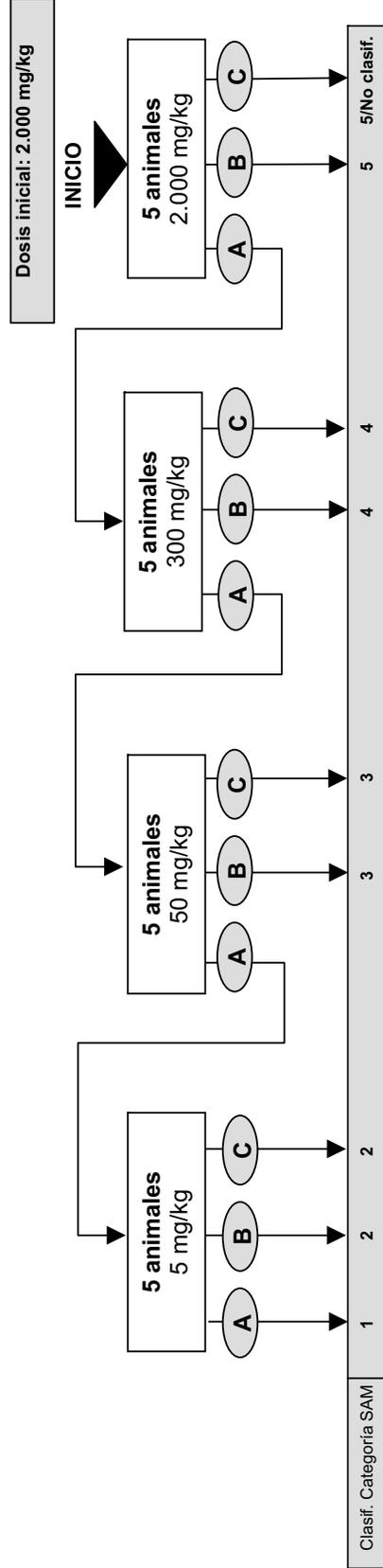
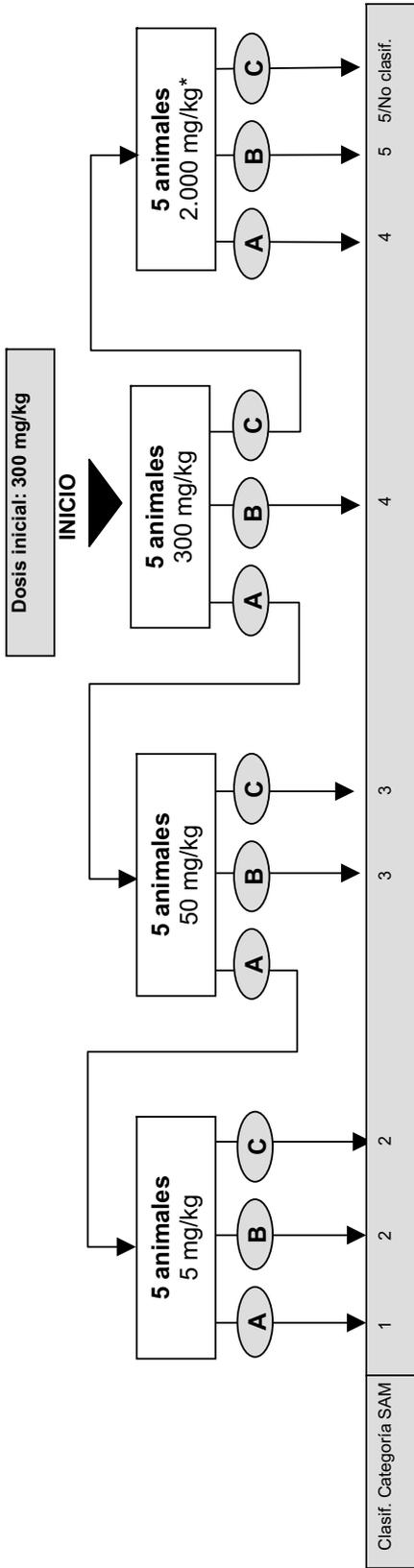
A ≥ 2 muertes

B ≥ 1 con toxicidad manifiesta y/o 1 muerte

C No hay toxicidad manifiesta ni muerte

Tamaño del grupo
Entre los 5 animales de cada grupo del estudio principal se incluirá cualquier animal tratado a ese nivel de dosis en el estudio preliminar

***Interrupción por razones de bienestar animal**
Si este nivel de dosis provoca la muerte en el estudio preliminar, no se tratarán más animales y se pasará directamente al resultado **A**



Resultado

A ≥ 2 muertes

B ≥ 1 con toxicidad manifiesta y/o 1 muerte

C No hay toxicidad manifiesta ni muerte

Tamaño del grupo
Entre los 5 animales de cada grupo del estudio principal se incluirá cualquier animal tratado a ese nivel de dosis en el estudio preliminar

***Interrupción por razones de bienestar animal**
Si este nivel de dosis provoca la muerte en el estudio preliminar, no se tratarán más animales y se pasará directamente al resultado **A**

ANEXO 3

CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS CON VALORES DL_{50} PREVISTOS SUPERIORES A LOS 2 000 mg/kg SIN NECESIDAD DE ENSAYO

Los criterios de la categoría de peligro 5 tienen por objeto permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que, en determinadas circunstancias, puedan representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una DL_{50} oral o dérmica dentro del intervalo 2 000- 5 000 mg/kg o dosis equivalentes por otras vías. Las sustancias estudiadas podrían clasificarse en la categoría de peligro definida por: 2 000 mg/kg $<DL_{50} < 5 000$ mg/kg (categoría 5 del SAM), en los siguientes casos:

- a) cuando cualquiera de los esquemas de ensayo del anexo 2 lleve a esta categoría, basándose en las cifras de mortalidad
- b) cuando se disponga ya de datos fiables que indiquen que la DL_{50} se sitúa dentro del intervalo de los valores de la categoría 5 o cuando otros estudios con animales o los efectos tóxicos observados en las personas indiquen un peligro agudo para la salud humana
- c) mediante extrapolación, estimación o medición de datos si no está justificada la clasificación en una categoría más peligrosa, y
 - se dispone de información fiable que indique la existencia de efectos tóxicos significativos en los seres humanos, o
 - se observe mortalidad cuando se efectúen ensayos hasta la categoría 4 por vía oral, o
 - cuando los dictámenes de expertos confirmen que se dan signos clínicos significativos de toxicidad al efectuar ensayos hasta los valores de la categoría 4, excepto en el caso de diarrea, piloerección o aspecto despeinado, o
 - cuando los dictámenes de expertos confirmen información fiable obtenida a partir de otros estudios con animales que indique un potencial de efectos agudos significativos.

ENSAYOS A DOSIS SUPERIORES A 2 000 mg/kg

Excepcionalmente, y sólo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otro nivel de dosis fija superior de 5 000 mg/kg. Reconociendo la necesidad de proteger el bienestar animal, se desaconseja el ensayo a la dosis 5 000 mg/kg. Éste sólo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal (9).

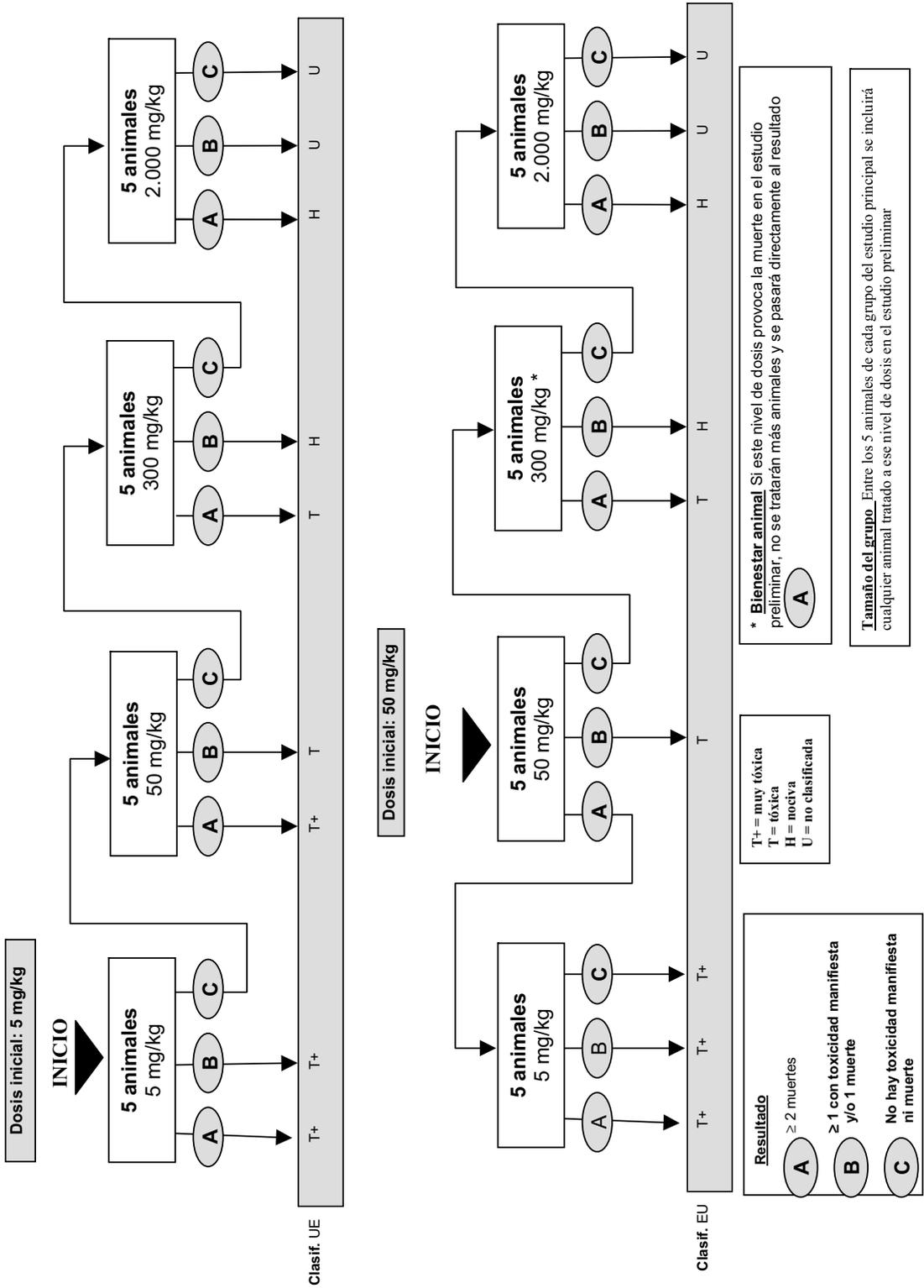
Estudio preliminar

Las normas para la toma de decisiones que rigen el procedimiento secuencial del anexo 1 se amplían de manera que incluyan el nivel de dosis 5 000 mg/kg. Por tanto, cuando se emplee una dosis inicial en el estudio preliminar de 5 000 mg/kg, el resultado A (muerte) obligará a que se haga un ensayo con otro animal a 2 000 mg/kg; los resultados B y C (toxicidad manifiesta o no toxicidad) permitirán la selección de la dosis de 5 000 mg/kg como dosis inicial del estudio principal. De la misma manera, si se utiliza una dosis inicial distinta de 5 000 mg/kg se pasará a la de 5 000 mg/kg en caso de que se den los resultados B o C a 2 000 mg/kg; un posterior resultado A a 5 000 mg/kg determinará una dosis inicial para el estudio principal de 2 000 mg/kg y los resultados B y C determinarán una dosis inicial para el estudio principal de 5 000 mg/kg.

Estudio principal

Las normas para la toma de decisiones que rigen el procedimiento secuencial del anexo 2 se amplían de manera que incluyan el nivel de dosis de 5 000 mg/kg. Por tanto, cuando se emplee una dosis inicial en el estudio principal de 5 000 mg/kg, el resultado A (≥ 2 muertes) obligará a que se haga un ensayo con un segundo grupo a 2 000 mg/kg; el resultado B (toxicidad manifiesta y/o ≤ 1 muerte) o C (no toxicidad) determinará que la sustancia se considere no clasificada con arreglo al SAM. De la misma manera, si se utiliza una dosis inicial distinta de 5 000 mg/kg se pasará a la de 5 000 mg/kg en caso de que se dé un resultado C a 2 000 mg/kg; un posterior resultado A a 5 000 mg/kg dará lugar a que la sustancia se clasifique en la categoría 5 del SAM y los resultados B y C a que se considere no clasificada.

ANEXO 4
 METODO DE PRUEBA B.1 bis – Orientaciones sobre clasificación según el plan comunitario para el período de transición hasta la plena aplicación del Sistema Armonizado Mundial (SAM) (tomado de (8))



ANEXO 2C

B.1 ter TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUCCIÓN

El método de las clases de toxicidad aguda (1) establecido en este ensayo es un procedimiento por fases en el que se utilizan 3 animales de un mismo sexo en cada fase. Según la mortalidad y/o la aparición de síntomas de agonía en los animales, pueden requerirse 2-4 fases para juzgar sobre la toxicidad aguda de la sustancia estudiada. Este procedimiento es reproducible, utiliza muy pocos animales y permite clasificar sustancias de manera semejante a los demás métodos de ensayo de toxicidad aguda. El método de las clases de toxicidad aguda se basa en evaluaciones biométricas (2)(3)(4)(5) con dosis fijas, separadas adecuadamente de manera que permitan ordenar una sustancia con fines de clasificación y evaluación de riesgos. Este método en su versión de 1996 fue validado ampliamente *in vivo* con respecto a datos DL_{50} tomados de la bibliografía, tanto a nivel nacional (6) como internacional (7).

En el Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8) se dan directrices sobre la selección del método de ensayo más adecuado en función del objetivo. Además, en este documento orientativo se facilita información complementaria sobre la realización e interpretación del método de ensayo B.1ter.

No es necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados por sus efectos corrosivos o muy irritantes. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo serán sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En otro documento orientativo (9) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

El método utiliza dosis previamente definidas y los resultados permiten ordenar y clasificar las sustancias de acuerdo con el Sistema Armonizado Mundial (SAM) (Globally Harmonised System (GHS)) de clasificación de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (10).

En principio, con este método no se pretende calcular una DL_{50} precisa, sino determinar unas gamas de exposición definidas en las que puede esperarse la aparición de letalidad, ya que la muerte de una parte de los animales sigue siendo su parámetro principal. El método permite la determinación del valor DL_{50} sólo cuando al menos dos dosis producen una mortalidad superior al 0% e inferior al 100%. La utilización de dosis previamente definidas, independientemente de la sustancia que se ensaye, y la relación explícita entre la clasificación y el número de animales observados en diferentes estados, mejora la concordancia entre la información facilitada por distintos laboratorios, así como la repetibilidad.

El laboratorio que haga los ensayos debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia estudiada antes de llevar a cabo el estudio. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo*, los datos toxicológicos sobre otras sustancias estructuralmente relacionadas, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los afectados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana y ayuda a la selección de la dosis inicial más adecuada.

1.2 DEFINICIONES

Toxicidad oral aguda: efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas dentro de un período de 24 horas.

Muerte retardada significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el período de observación de 14 días.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. La dosis se expresa en peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal sometido al experimento (por ejemplo, mg/kg).

SAM: Sistema Armonizado Mundial (Globally Harmonised System (GHS)) de clasificación y etiquetado de productos químicos. Actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), el Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas (propiedades fisico-químicas) y la OIT (comunicación de riesgos), coordinada por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de Sustancias Químicas (IOMC, en sus siglas inglesas).

Muerte inminente: fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación previsto. Entre los signos que indican esta situación en los roedores cabe citar: convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. (Para más información véase el Humane Endpoint Guidance Document (9)).

DL_{50} (dosis letal mediana): dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. El valor de la DL_{50} se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (mg/kg).

Dosis límite: dosis del límite máximo del ensayo (2 000 o 5 000 mg/kg).

Agonía: situación en la que el animal se está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento. (Para más información véase el Humane Endpoint Guidance Document (9)).

Muerte previsible: presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua. (Véase el Humane Endpoint Guidance Document (9) para más información).

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio en el que se inspira el ensayo, basado en un procedimiento por fases en cada una de las cuales se utiliza un número mínimo de animales, es obtener información sobre la toxicidad aguda de la sustancia estudiada que sea suficiente para permitir su clasificación. La sustancia se administra por vía oral a un grupo de animales de experimentación a una de las dosis definidas. En el ensayo se sigue un procedimiento por fases, utilizándose en cada fase tres animales del mismo sexo (normalmente hembras). Según la ausencia o presencia de mortalidad debida a la sustancia en los animales tratados en una fase determinada se decide cuál será la fase siguiente, es decir:

- terminación del ensayo (no se requieren más ensayos)
- administración de la misma dosis de la sustancia a otros tres animales
- administración de la dosis inmediatamente superior o inferior a otros tres animales.

En el Anexo 1 se dan detalles del procedimiento del ensayo. El método permitirá emitir un juicio respecto a la clasificación de la sustancia en una clase de toxicidad dentro de una serie de clases definidas mediante valores límite de DL_{50} .

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Selección de la especie animal

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se emplean hembras (9). Se hace así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de DL_{50} muestra que normalmente hay poca diferencia en cuanto a sensibilidad entre los sexos, pero, en los casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles (11). Sin embargo, si se conocen propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que es probable que los machos sean más sensibles, deberá utilizarse este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente.

Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El animal, al inicio de la administración de la sustancia, debe tener entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo del $\pm 20\%$ del peso medio de los animales a los que previamente se haya administrado la sustancia.

1.4.2 Alojamiento y alimentación

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Aunque la humedad relativa debe ser como mínimo del 30% y preferiblemente no superior al 70%, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede darse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

1.4.3 Preparación de los animales

Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar la administración de la sustancia, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

1.4.4 Preparación de las dosis

En general, las sustancias estudiadas deben administrarse en un volumen constante para toda la gama de dosis que deban ensayarse, variando la concentración del preparado administrado. Sin embargo, cuando deba administrarse una mezcla o producto final líquidos, puede resultar más adecuado para la posterior evaluación de riesgos utilizar la sustancia no diluida, es decir, a una concentración constante. Algunas autoridades reguladoras establecen este criterio con carácter obligatorio. En cualquiera de los dos casos, no debe superarse el volumen de dosis máximo. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. En los roedores, el volumen no debe sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, de las que se pueden usar 2 ml/100 g de peso corporal. En cuanto a la formulación del preparado que se administre, se recomienda el uso de una solución/suspensión/emulsión acuosa siempre que sea posible, seguida, en orden de preferencia, por una solución/suspensión/emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca la estabilidad del preparado durante el período en que se vaya a utilizar y conste que ésta es aceptable.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 Administración de las dosis

La sustancia estudiada se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o cánula adecuada de intubación. Cuando se dé el caso, poco habitual, de que no pueda administrarse una dosis única, se podrá dividir ésta en pequeñas partes durante un período que no sobrepase las 24 horas.

Los animales se mantendrán en ayunas antes de la administración de la dosis (por ejemplo, las ratas no deberán recibir alimento alguno durante la noche, pero sí agua; los ratones no deberán recibir alimento durante 3-4 horas, pero sí agua). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada ésta, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 ó 4 horas en el caso de las ratas y 1 ó 2 horas cuando se trate de ratones. Si se administra la dosis en pequeñas partes a lo largo de un cierto período podrá ser necesario dar comida y bebida a los animales, en función de la duración de dicho período.

1.5.2 **Número de animales y dosis**

Se utilizarán tres animales en cada fase. La dosis inicial se seleccionará entre las cuatro dosis fijas, es decir, 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg de peso corporal. La dosis inicial será la que produzca con mayor probabilidad la muerte de algunos de los animales a los que se administre. En los diagramas del anexo 1 se describe el procedimiento que debe seguirse para cada una de las dosis iniciales. Además, el anexo 4 da orientaciones sobre la clasificación en el sistema comunitario hasta que se aplique el nuevo SAM.

Cuando la información indique que no es probable la aparición de mortalidad con la dosis inicial máxima (2 000 mg/kg peso corporal), se realizará una prueba límite. Si no hay información sobre una sustancia estudiada, por razones de bienestar animal, se recomienda utilizar como dosis inicial 300 mg/kg peso corporal.

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

Excepcionalmente, y sólo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otro nivel de dosis superior de 5 000 mg/kg (véase el anexo 2). Por razones de bienestar animal, se desaconseja el ensayo en animales de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (2 000-5 000 mg/kg). Este ensayo sólo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal o del medio ambiente.

1.5.3 **Ensayo límite**

El ensayo límite se utiliza en situaciones en las que el experimentador tiene información de que la sustancia estudiada es probable que no sea tóxica, es decir, sólo resulta tóxica por encima de las dosis límite reglamentarias. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos, mezclas o productos ensayados semejantes, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en la que se prevé que ésta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 2 000 mg/kg peso corporal con seis animales (tres por fase). Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 5 000 mg/kg peso corporal con tres animales (véase el anexo 2). Si aparece mortalidad debida a la sustancia, puede ser necesario realizar una prueba complementaria al nivel inmediatamente inferior.

1.6 **OBSERVACIONES**

Tras la administración de la dosis, se observan los animales uno por uno, al menos una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención durante las primeras 4 horas, y a continuación diariamente, a lo largo de un total de 14 días, excepto cuando tengan que eliminarse del estudio y sacrificarse de manera compasiva por razones de bienestar animal o bien cuando resulten muertos. Sin embargo, no se debería fijar rígidamente la duración de la observación sino que ésta debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos (12). Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

Será necesario hacer más observaciones si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad locomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el Humane Endpoints Guidance Document (8). Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso y signos continuos de sufrimiento intenso deberán sacrificarse de forma compasiva. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

1.6.1 **Peso corporal**

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

1.6.2 **Patología**

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

2. **RESULTADOS**

Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, se reunirán todos los resultados en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el

ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la necropsia.

3. INFORME

3.1 Informe del ensayo

El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Sustancia estudiada:

- naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización);
- identificación química, incluido el número CAS.

Vehículo (si procede):

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

- especie y cepa utilizadas
- situación microbiológica de los animales, cuando se conozca
- número, edad y sexo de los animales (incluida, cuando proceda, una justificación del uso de machos en vez de hembras)
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones de ensayo:

- información sobre la formulación de la sustancia de ensayo, incluida la forma física del material administrado
- datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración
- datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluido el origen/tipo de la dieta y el origen del agua)
- justificación de la elección de la dosis inicial.

Resultados:

- tabulación de las respuestas y los niveles de dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad naturaleza, gravedad y duración de los efectos)
- tabulación del peso corporal y los cambios en el mismo
- peso de cada animal el día en que se administre la dosis, posteriormente a intervalos semanales, y en el momento de la muerte o el sacrificio
- fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio previsto
- cronología de la aparición de signos de toxicidad e indicación de si éstos son reversibles en cada animal
- resultados de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados.

Conclusiones.

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett., Suppl.* 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559-610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, 129-134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.

- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

ANEXO 1

PROCEDIMIENTO QUE DEBE SEGUIRSE PARA CADA UNA DE LAS DOSIS INICIALES

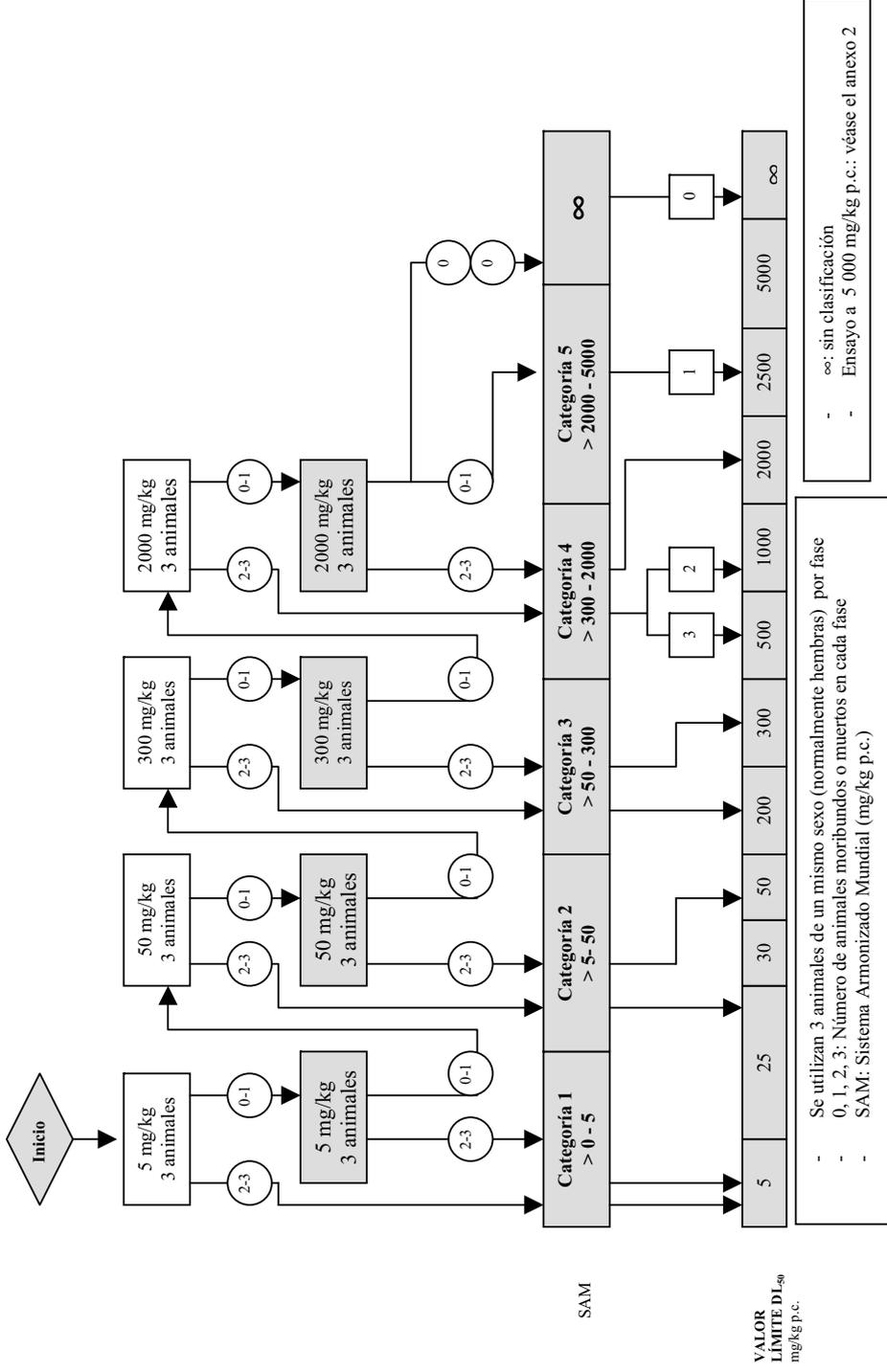
OBSERVACIONES GENERALES

Para cada dosis inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

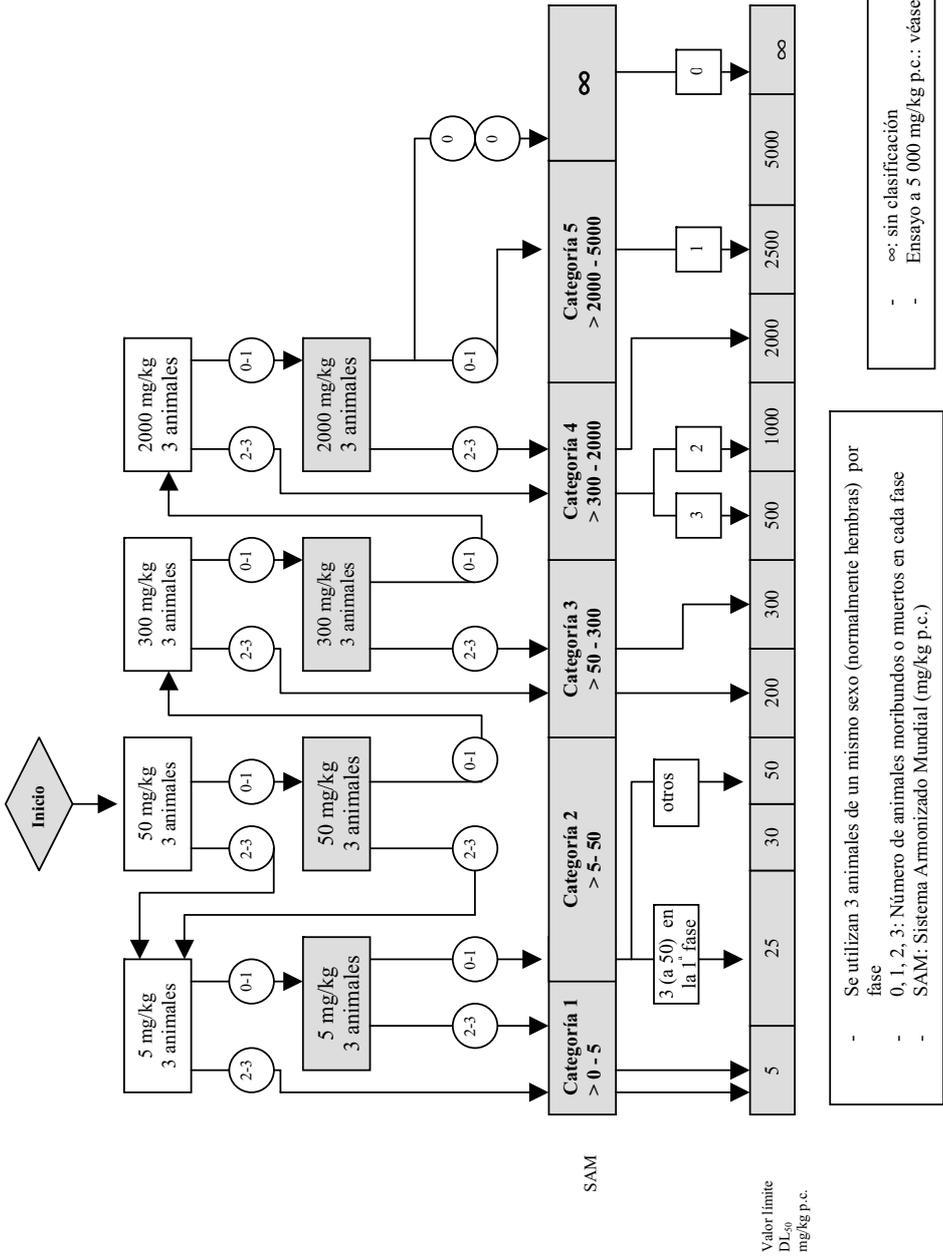
- Anexo 1 a: la dosis inicial es 5 mg/kg de peso corporal.
- Anexo 1 b: la dosis inicial es 50 mg/kg de peso corporal.
- Anexo 1 c: la dosis inicial es 300 mg/kg de peso corporal.
- Anexo 1 d: la dosis inicial es 2 000 mg/kg de peso corporal.

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

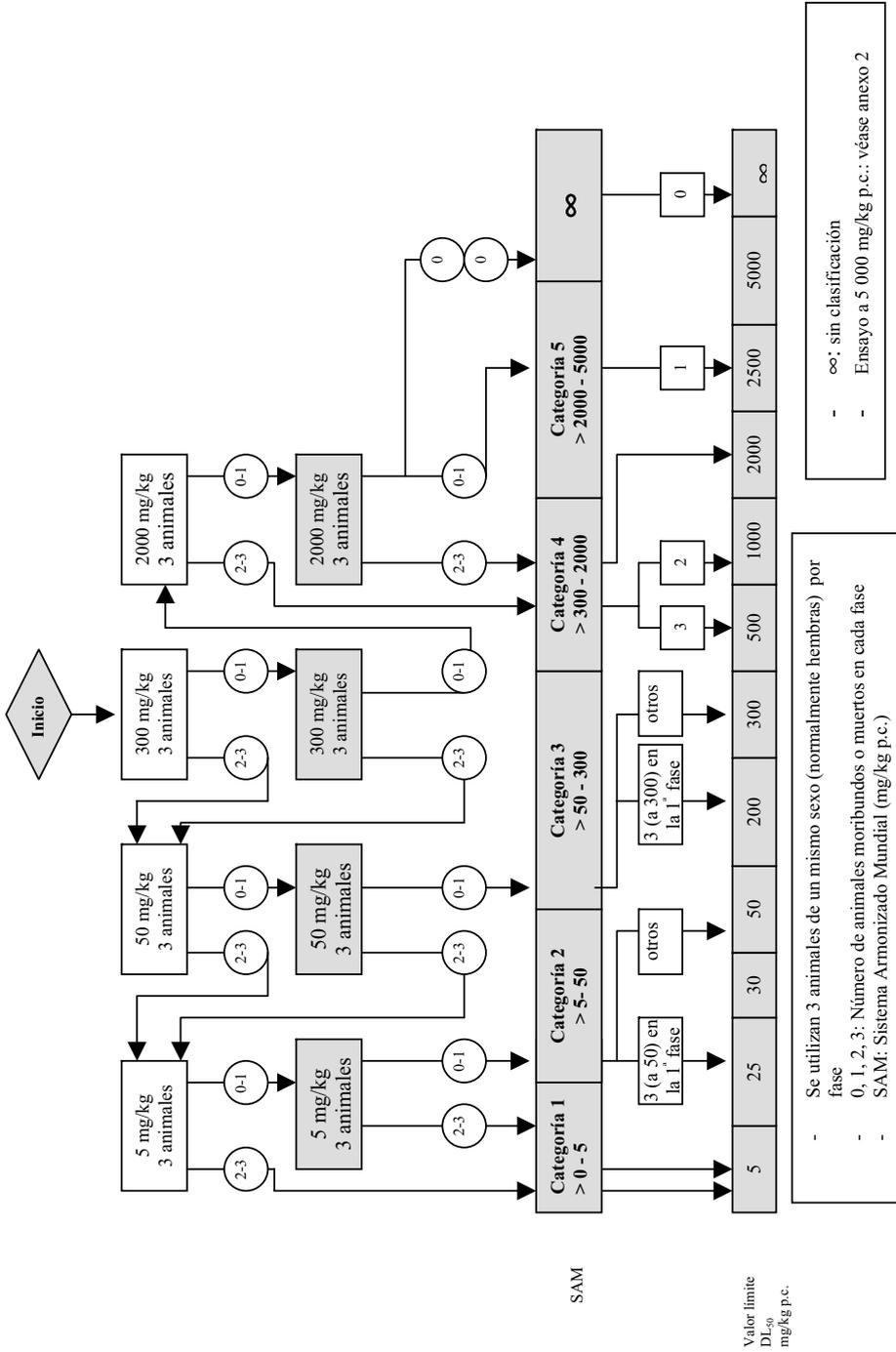
ANEXO 1 A
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 5 MG/KG DE PESO CORPORAL



ANEXO I B
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 50 MG/KG DE PESO CORPORAL



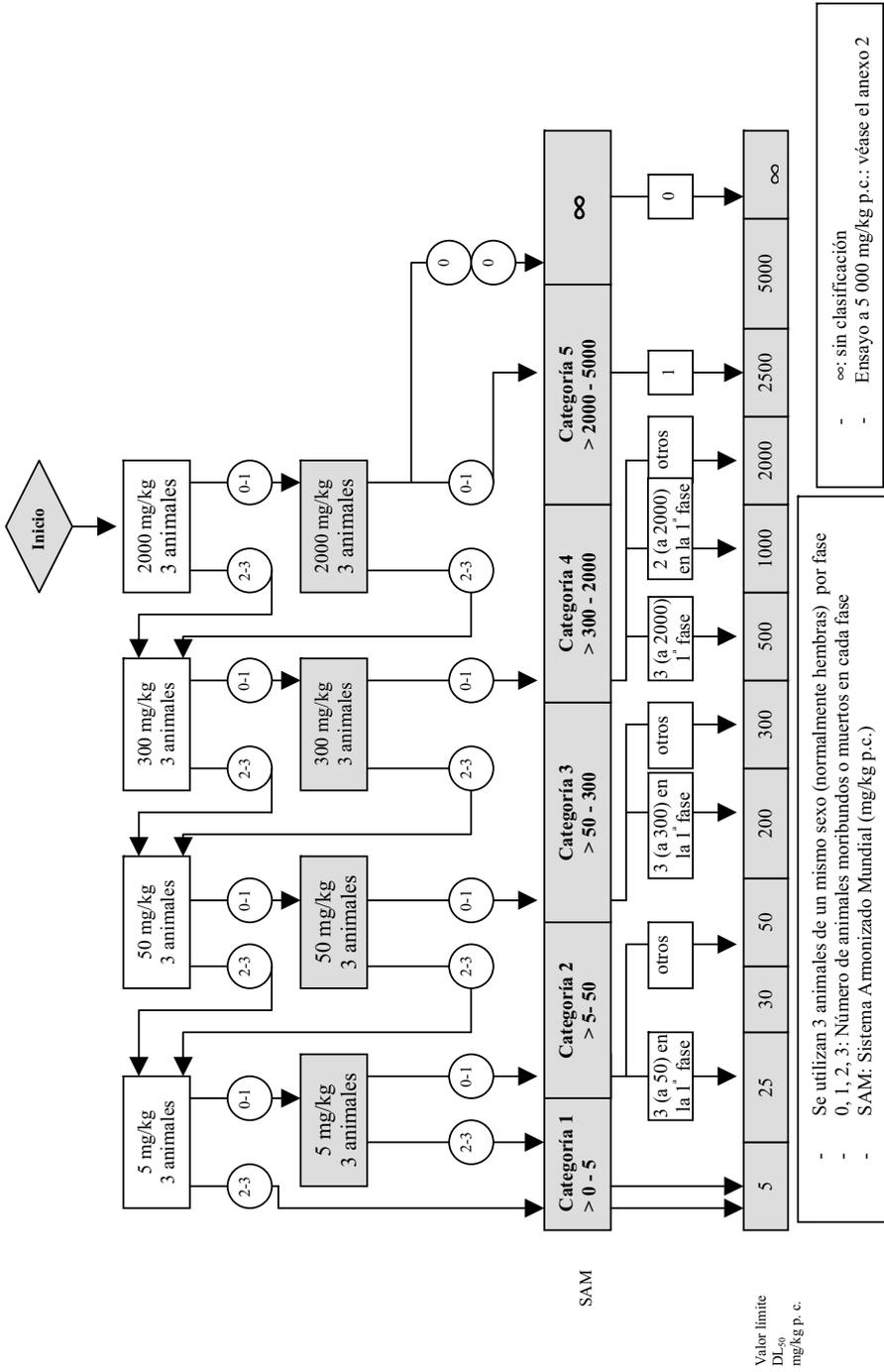
ANEXO 1 C
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 300 MG/KG DE PESO CORPORAL



SAM

Valor límite
DL₅₀
mg/kg p.c.

**ANEXO 1 D
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 2 000 MG/KG DE PESO CORPORAL**



SAM

Valor límite
DL₅₀
mg/kg p. c.

ANEXO 2**CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS CON VALORES DL_{50} PREVISTOS SUPERIORES A LOS 2 000 mg/kg SIN NECESIDAD DE ENSAYO**

Los criterios de la categoría de peligro 5 tienen por objeto permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que, en determinadas circunstancias, puedan representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una DL_{50} oral o dérmica dentro del intervalo 2 000- 5 000 mg/kg o dosis equivalentes por otras vías. Las sustancias estudiadas deben clasificarse en la categoría de peligro definida por 2 000 mg/kg $<DL_{50} < 5 000$ mg/kg (categoría 5 del SAM), en los siguientes casos:

- a) cuando cualquiera de los esquemas de ensayo del anexo 1a - 1d lleve a esta categoría, basándose en las cifras de mortalidad;
- b) cuando se disponga ya de datos fiables que indiquen que la DL_{50} se sitúa dentro del intervalo de los valores de la categoría 5; o cuando otros estudios en animales o los efectos tóxicos observados en las personas susciten inquietud grave acerca de la salud humana
- c) mediante extrapolación, estimación o medición de datos si no está justificada la clasificación en una categoría más peligrosa, y
 - se dispone de información fiable que indique la existencia de efectos tóxicos significativos en los seres humanos, o
 - se observe mortalidad cuando se efectúen ensayos hasta la categoría 4 por vía oral, o
 - cuando los dictámenes de expertos confirmen que se dan signos clínicos significativos de toxicidad al efectuar ensayos hasta los valores de la categoría 4, excepto en el caso de diarrea, piloerección o aspecto alterado, o
 - cuando los dictámenes de expertos confirmen información fiable obtenida a partir de otros estudios en animales que indique un potencial de efectos agudos significativos.

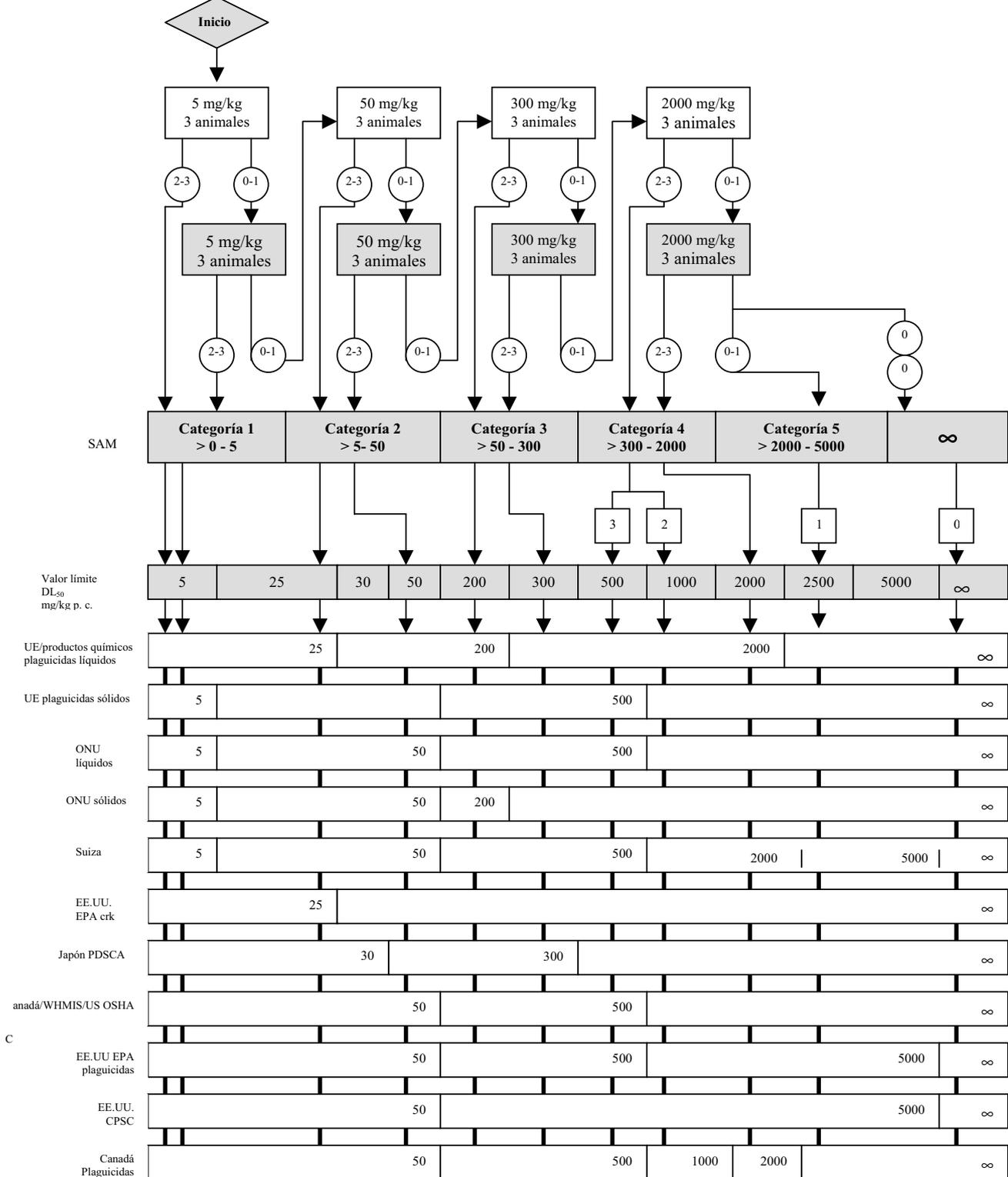
ENSAYOS A DOSIS SUPERIORES A 2 000 mg/kg

Reconociendo la necesidad de proteger el bienestar animal, se desaconseja el ensayo de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (2.000-5.000 mg/kg) con animales. Éste sólo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal (10). No deben hacerse otros ensayos a dosis superiores.

Cuando tenga que hacerse un ensayo a 5 000 mg/kg, sólo se requiere una fase (es decir, tres animales). Si el primer animal al que se administre la dosis muere, se pasará a la dosis de 2 000 mg/kg de acuerdo con los diagramas del anexo 1. Si el primer animal sobrevive, se tratará a dos animales más. Si muere sólo uno de los tres animales, se prevé que la DL_{50} supere los 5 000 mg/kg. Si ambos animales mueren, se pasará a la dosis de 2 000 mg/kg.

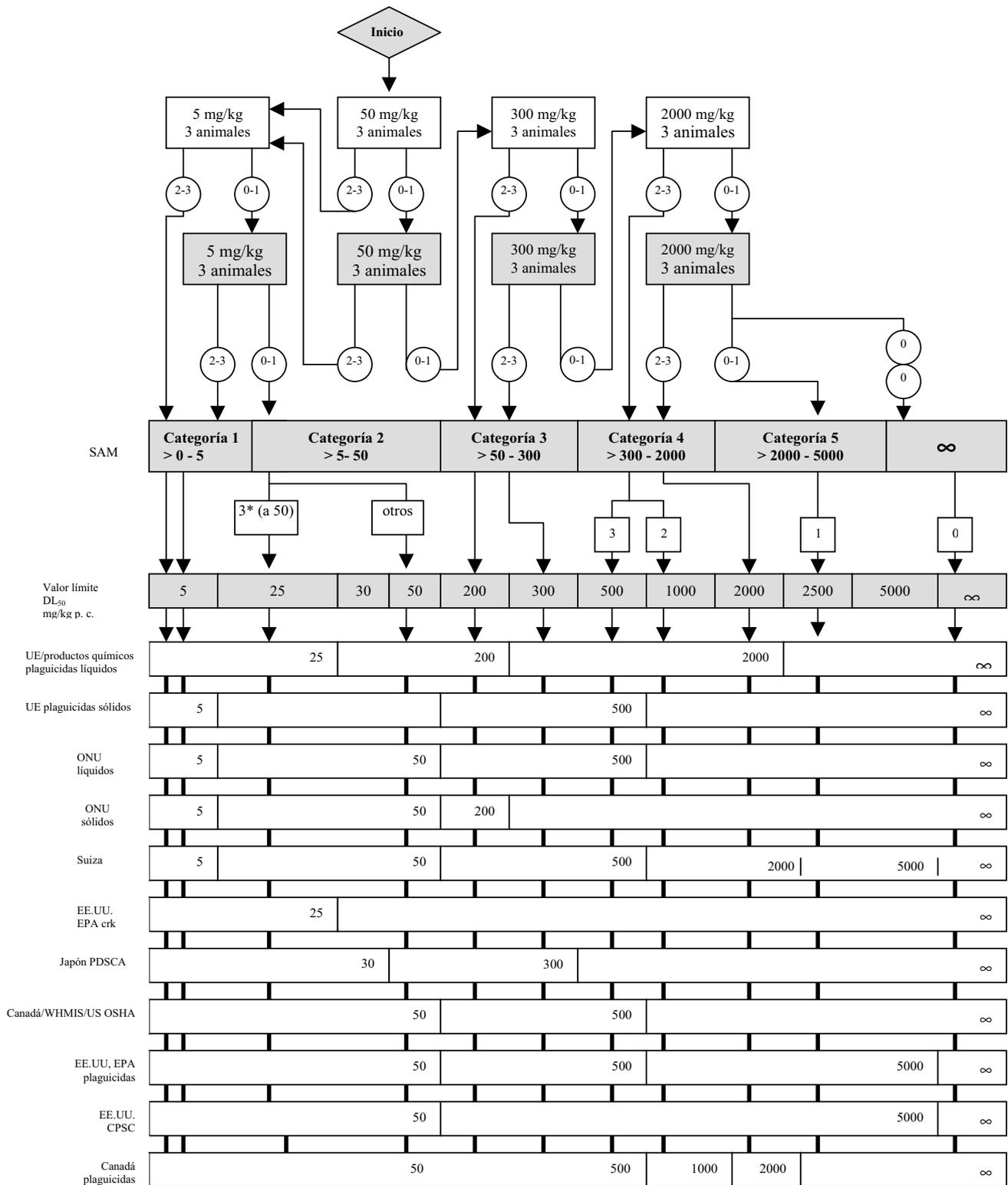
ANEXO 3

METODO DE PRUEBA B.1 ter: Orientaciones sobre clasificación según el plan comunitario para el período de transición hasta la plena aplicación del Sistema Armonizado Mundial (SAM) (tomado de (8))



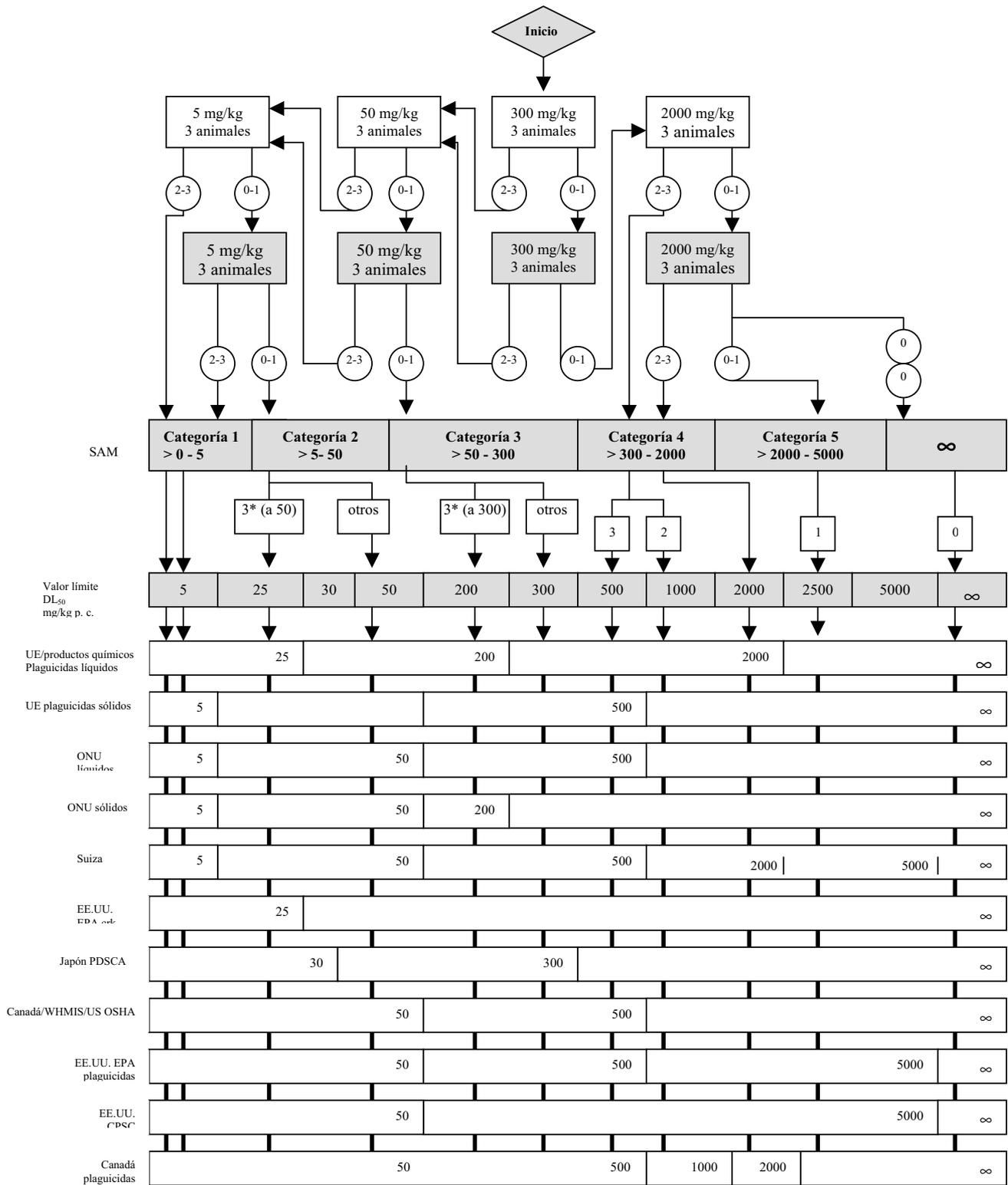
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
 - 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase

- ∞: sin clasificación
 - SAM: Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)



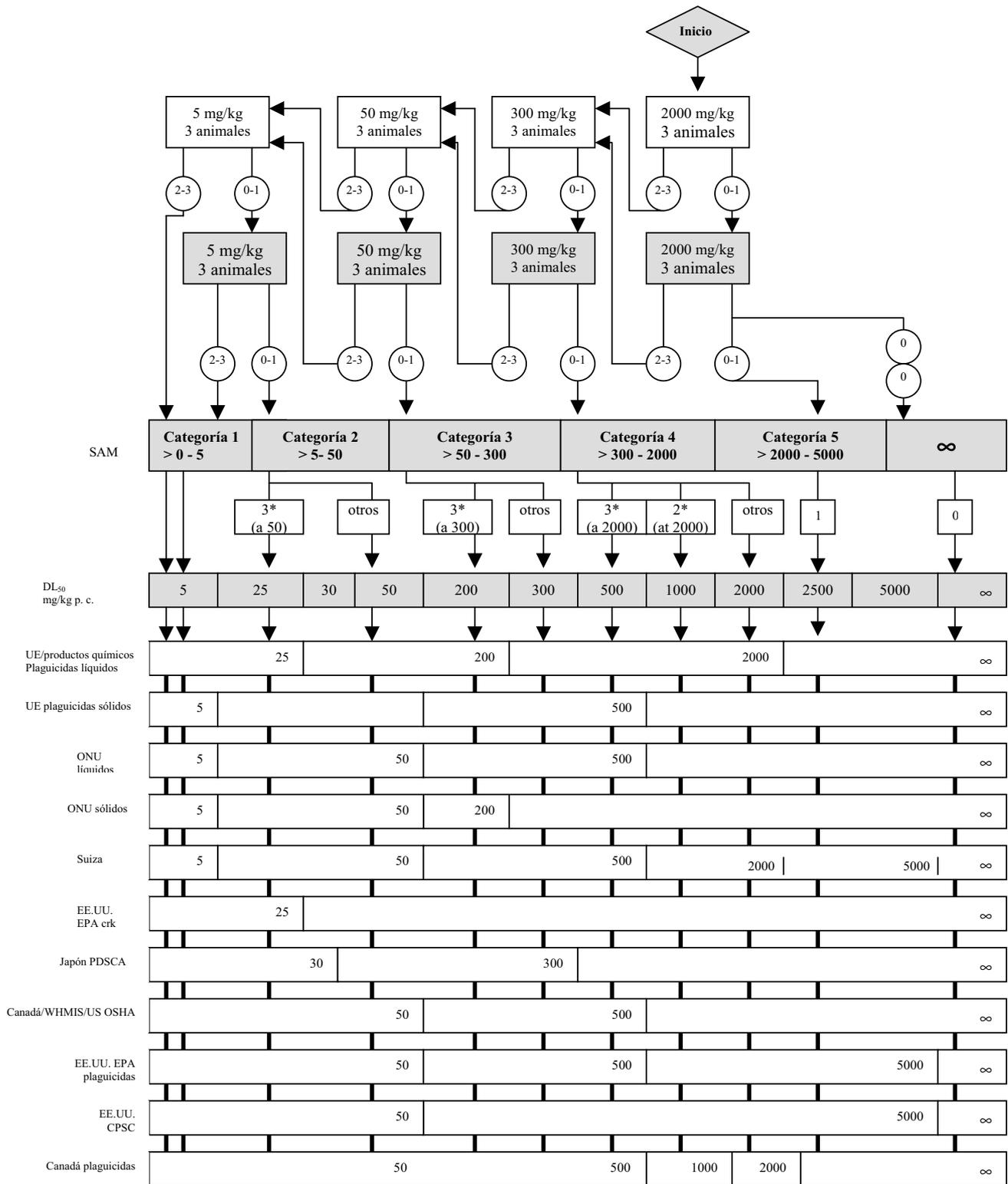
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
 - 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase

- 8: sin clasificación
 - *: en la primera fase
 -SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)



- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
 - 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase

- ∞: sin clasificación
 - *: en la primera fase
 -SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)



| | |
|--|--|
| - Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase - 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase | - 8: sin clasificación - *: en la primera fase - SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.) |
|--|--|

ANEXO 2D

B. 4. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA

1. MÉTODO

Este método de evaluación es equivalente al método TG 404 de la OCDE (2002).

1.1 INTRODUCCIÓN

En el desarrollo la confección de este método actualizado se ha prestado atención especial a las posibles mejoras en relación con las cuestiones del bienestar de los animales y con la evaluación de toda la información existente sobre la sustancia analizada, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias. En este método se incluye la recomendación de que, antes de llevar a cabo la prueba *in vivo* que se describe para evaluar la corrosión/irritación de la sustancia, hay que analizar la carga de la prueba que aportan los datos relevantes existentes. Cuando los datos disponibles sean insuficientes, se podrán obtener mediante la aplicación de secuencias de pruebas (1). La estrategia de evaluación recomendada incluye la realización de pruebas *in vitro* validadas y aceptadas, y se recoge en un anexo de este método. Además, cuando proceda, se recomienda la aplicación sucesiva, no simultánea, de tres aplicaciones de ensayo a los animales en el ensayo *in vivo* inicial.

Por interés de la ciencia y del bienestar de los animales no se realizarán pruebas *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos relevantes sobre el potencial de corrosión/irritación cutánea de la sustancia en un análisis de la carga de la prueba. Dichos datos incluirán los obtenidos en estudios existentes realizados con seres humanos o con animales de laboratorio, los demostrativos de corrosión/irritación por parte de una o más sustancias relacionadas estructuralmente o por una mezcla de las mismas, los que demuestran la elevada acidez o alcalinidad de la sustancia (2)(3) y los obtenidos en pruebas *in vitro* o *ex vivo* validadas y aceptadas (4)(5)(5a). Este análisis debe reducir la necesidad de realizar pruebas *in vivo* de la corrosión/irritación cutánea de aquellas sustancias de las que ya se disponga de datos de otros estudios efectuados sobre esos dos criterios de valoración.

En un anexo de este método se recoge el orden recomendado para efectuar los ensayos, incluidos los ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados sobre corrosión e irritación. Se trata de una estrategia desarrollada por un taller de la OCDE, cuyos participantes la recomendaron de manera unánime (6), y ha sido adoptada como estrategia de evaluación por el sistema armonizado global para la clasificación de sustancias químicas (*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances*, GHS) (7). Aunque dicha estrategia de evaluación secuencial no forma parte integrante del método de evaluación B.4, se recomienda seguirla antes de llevar a cabo ensayos *in vivo*. Es el nuevo enfoque de evaluación escalonada recomendado para obtener datos científicamente garantizados sobre la corrosión/irritación de la sustancia. Para sustancias existentes con datos insuficientes sobre su corrosión/irritación cutánea se utilizará la estrategia para obtener los datos que falten. Será necesario justificar el empleo de una estrategia o procedimiento de evaluación diferente, o la decisión de no utilizar un procedimiento escalonado.

Si no fuera posible determinar el poder de corrosión o irritación mediante un análisis de la carga de la prueba compatible con la estrategia secuencial de evaluación, se considerará la posibilidad de realizar un ensayo *in vivo* (véase el anexo).

1.2 DEFINICIONES

Irritación cutánea: lesión reversible de la piel tras la aplicación de una sustancia de ensayo durante 4 horas.

Corrosión cutánea: lesión irreversible de la piel; en concreto, necrosis visible de la epidermis y la dermis, que se produce tras la aplicación de una sustancia de ensayo durante cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, hemorragias, costras sanguinolentas y, al cabo de 14 días de observación, cambio de coloración por palidez de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Para evaluar las lesiones cuestionables se utilizará la histopatología.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

La sustancia analizada se aplica en una sola dosis a la piel de un animal de experimentación; las zonas de la piel no tratadas de dicho animal sirven de control. Se comprueba y puntúa el grado de irritación/corrosión a intervalos determinados, y luego se describen para la completa evaluación de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.

Los animales que muestren signos continuados de deterioro o dolor graves en cualquier fase del ensayo deben ser sacrificados, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Los criterios para sacrificar a los animales moribundos y que sufren intensamente se recogen en la referencia (8).

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Preparación para el ensayo *in vivo*

1.4.1.1 Selección de las especies de animales

El animal de laboratorio que se prefiere es el conejo albino; se utilizan adultos jóvenes sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

1.4.1.2 Preparación de los animales

Aproximadamente 24 horas antes del ensayo se afeitará el pelo con cuidado en la zona dorsal del tronco de los animales. Se tendrá cuidado en no dañar la piel, y sólo se utilizarán animales con piel sana e intacta.

Algunas razas de conejo tienen densas placas de pelo que son más llamativas en determinadas épocas del año. Dichas zonas no deben utilizarse para las evaluaciones.

1.4.1.3 *Condiciones de alojamiento y alimentación*

Los animales deben ser alojados de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 °C (\pm 3 °C) para los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30% como mínimo y preferiblemente no superar el 70%, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60%. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

1.4.2 **Procedimiento del ensayo**

1.4.2.1 *Aplicación de la sustancia estudiada*

La sustancia en estudio debe aplicarse a una pequeña zona de piel (de unos 6 cm²), que se cubrirá con una gasa y se sujetará con esparadrapo no irritante. Cuando no sea posible la aplicación directa (por ejemplo, líquidos o algunas pastas), la sustancia en estudio se aplicará primero a la gasa, y a continuación a la piel. La gasa debe quedar en contacto suave con la piel mediante el correspondiente vendaje semioclusivo durante el período de exposición. Si se aplica la sustancia a la gasa, ésta debe sujetarse a la piel de forma que el contacto sea bueno y la sustancia se distribuya de manera uniforme por la piel. Se evitará que el animal tenga acceso a la gasa y que pueda comérsela o inhalar la sustancia.

Las sustancias líquidas suelen utilizarse sin diluir para su análisis. Para evaluar sólidos (que se pueden pulverizar si se considera necesario) la sustancia se humedecerá con el mínimo de agua posible (o con otro vehículo adecuado, si se considera necesario), para garantizar un buen contacto con la piel. Si se utilizan vehículos distintos del agua, la posible influencia del vehículo sobre la irritación cutánea que produce la sustancia en estudio ha de ser mínima o nula.

Finalizado el período de exposición, que normalmente es de 4 horas, se eliminarán los residuos de la sustancia cuando ello sea posible, con agua o con un disolvente adecuado que no altere la respuesta producida ni la integridad de la epidermis.

1.4.2.2 *Nivel de dosis*

Se aplicará una dosis de 0,5 ml de líquido o de 0,5 de sólido o pasta en el punto de aplicación.

1.4.2.3 **Ensayo inicial** (*ensayo de irritación/corrosión cutánea in vivo con un animal*)

Se recomienda encarecidamente realizar el ensayo *in vivo* inicialmente con un solo animal, especialmente cuando se sospecha que la sustancia es corrosiva. Esto coincide con la estrategia de evaluación secuencial (véase el Anexo 1).

Cuando el análisis de la carga de la prueba determine que una sustancia es corrosiva no se realizarán más ensayos con animales. En la mayor parte de los casos en que se sospecha que una sustancia es corrosiva no es necesario realizar más ensayos *in vivo*. Pero cuando se crea necesario disponer de datos adicionales por no ser suficientes los obtenidos, pueden hacerse otros ensayos con animales con arreglo a lo siguiente: Se hará un máximo de tres aplicaciones secuenciales al animal. La primera se retira a los tres minutos. Si no se observa reacción cutánea grave se aplica una segunda, que se retira al cabo de una hora. Si en este momento las observaciones indican que desde un punto humanitario se puede aumentar la exposición hasta cuatro horas, se hace una tercera aplicación que se retira al cabo de cuatro horas, y se gradúa la respuesta.

Si en alguna de las exposiciones secuenciales se observa un efecto corrosivo se suspende la prueba inmediatamente. Si una vez retirada la última aplicación no se observa efecto corrosivo, se somete a observación al animal durante 14 días, a menos que aparezca corrosión antes.

Si no está previsto que la sustancia analizada sea corrosiva pero sí irritante, se hará una sola aplicación a un solo animal durante cuatro horas.

1.4.2.4 **Ensayo de confirmación** (*ensayo de irritación cutánea in vivo con animales adicionales*)

Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más, cada uno con una aplicación, durante un período de exposición de cuatro horas. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial el ensayo de confirmación debe hacerse de forma secuencial, o exponiendo a otros dos animales a la vez. En el caso excepcional de que no se realice el ensayo inicial se podrán tratar dos o tres animales con una sola aplicación, que se retirará al cabo de cuatro horas. Cuando se utilicen dos animales no será necesario realizar más ensayos si ambos muestran la misma respuesta. En caso contrario se analizará el tercer animal. Si la respuesta es equívoca puede ser necesario evaluar a más animales.

1.4.2.5 *Período de observación*

La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la reversibilidad de los efectos observados. No obstante se dará por finalizado el experimento si en cualquier momento el animal presenta signos continuados de dolor o malestar graves. Para determinar la reversibilidad de los efectos los animales serán sometidos a observación durante 14 días a partir de la retirada de las aplicaciones. Si se observa la irreversibilidad antes de 14 días el experimento debe concluir en ese momento.

1.4.2.6 *Observaciones clínicas y graduación de las reacciones cutáneas*

En todos los animales se examinarán los signos de eritema y edema, puntuando las repuestas al cabo de 60 minutos, 24, 48 y 72 horas de la retirada de la aplicación. En el caso de ensayo inicial con un solo animal la zona de ensayo también se examina inmediatamente después de retirar la aplicación. Las reacciones cutáneas se gradúan y registran conforme a los grados de la siguiente tabla. Si al cabo de 72 horas hay una lesión que no se puede clasificar como irritación o corrosión, quizá sea necesario observarla hasta el día 14 para determinar la reversibilidad de los efectos. Además de observar la irritación se realizará una descripción completa de todos los efectos tóxicos, como la destrucción de la grasa de la piel, y de cualquier efecto adverso sistémico (por ejemplo, los efectos sobre los signos clínicos de toxicidad y el peso corporal), que se registrarán. Puede ser necesaria una evaluación histopatológica para aclarar respuestas equívocas.

La graduación de las respuestas cutáneas es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal graduación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado (véase la tabla siguiente). Puede ser útil disponer de una guía ilustrada para graduar la irritación cutánea y otras lesiones (9). La graduación de las respuestas cutáneas debe hacerse en condiciones ciegas.

2. DATOS

2.1 PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio se resumirán en tablas; el informe final debe cubrir todos los apartados enumerados en la sección 3.1.

2.2 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las puntuaciones de la irritación cutánea deben evaluarse junto con la naturaleza y la intensidad de las lesiones, y el hecho de si son reversibles o no. Las puntuaciones individuales no constituyen una referencia absoluta de la propiedades irritativas del material, pues también se evalúan otros efectos del material evaluado. En su lugar las puntuaciones individuales deben considerarse como valores de referencia, que han de ser evaluadas en combinación con todas las demás observaciones del estudio.

Para evaluar las respuestas irritativas hay que tener en cuenta la reversibilidad de las lesiones cutáneas. Si se producen respuestas como alopecia (zona limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación y persisten al final del período de observación de 14 días se considerará que la sustancia analizada es un irritante.

3. NOTIFICACIÓN

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la siguiente información:

Justificación del ensayo *in vivo*: análisis de la carga de los ensayos realizados anteriormente, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial.

- descripción de datos relevantes de ensayos realizados anteriormente;
- datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación;
- descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos los resultados obtenidos con las sustancias analizadas/de referencia;
- análisis de la carga de la prueba para realizar el estudio *in vivo*.

Sustancia analizada:

- datos de identificación (por ejemplo, número CAS; origen; pureza; impurezas conocidas; número de lote);
- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad);
- si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de los componentes.

Vehículo:

- identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado;
- justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

- especie/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos;
- número de animales de cada sexo;
- peso de los animales individuales al principio y al final del ensayo;
- edad al inicio del estudio;
- origen de los animales, condiciones del alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del análisis:

- técnicas de preparación de la zona donde se realizará el análisis;
- detalles de los materiales del parche utilizados, y de la técnica de aplicación del parche;
- detalles de la preparación, aplicación y retirada de la sustancia analizada.

Resultados:

- tabulación de las puntuaciones de las respuestas de irritación/corrosión de cada animal en todos los puntos temporales medidos;
- descripciones de todas las lesiones observadas;
- descripción narrativa de la naturaleza y el grado de irritación o de corrosión observado, y hallazgos histopatológicos efectuados;
- descripción de otros efectos adversos locales (por ejemplo, destrucción de la grasa de la piel) y sistémicos, además de la irritación o corrosión cutánea.

Comentario de los resultados

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 - 429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 - 26.

- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. *ATLA* 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Bruselas.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzthutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, 483 – 524.
- (5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pronunciado en Solna, Suecia, 22 - 24 de enero de 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviembre de 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, agosto de 1990.
[Puede solicitarse a la Secretaría de la OCDE].

TABLA I: GRADUACIÓN DE LAS REACCIONES CUTÁNEAS

Eritema y formación de escaras

| | |
|--|---|
| Sin eritema | 0 |
| Eritema muy leve (apenas perceptible) | 1 |
| Eritema bien definido | 2 |
| Eritema moderado a intenso | 3 |
| Eritema intenso (enrojecimiento color carne) o formación de escaras que impide graduarlo | 4 |

Máximo posible 4

Formación de edema

| | |
|---|---|
| Sin edema | 0 |
| Edema muy leve (apenas perceptible) | 1 |
| Edema ligero (los bordes de la zona están bien definidos por elevaciones concretas) | 2 |
| Edema moderado (elevación de 1 mm aproximadamente) | 3 |
| Edema intenso (elevación superior a 1 mm y extensión que sobrepasa la zona de exposición) | 4 |

Máximo posible 4

Puede ser necesaria una evaluación histopatológica para aclarar respuestas equívocas.

ANEXO

Estrategia de evaluación secuencial de la irritación y la corrosión cutáneas

CONSIDERACIONES GENERALES

Aunque la presente estrategia de evaluación secuencial no forma parte integrante del método de evaluación B.4., sí expresa el enfoque recomendado para la determinación de las características de irritación/corrosión cutáneas. Este enfoque representa la práctica óptima y una piedra angular desde el punto de vista ético para el análisis *in vivo* de la irritación/corrosión cutáneas. El método de evaluación proporciona instrucciones para la realización del ensayo *in vivo*, y resume los factores que se han de abordar antes de ponerla en marcha. La estrategia proporciona un enfoque para la evaluación de los datos existentes sobre las propiedades de irritación/corrosión cutáneas de las sustancias analizadas, y un enfoque por partes para generar datos relevantes sobre sustancias que necesitan estudios adicionales o que no han sido estudiadas. También recomienda la realización de ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados para la corrosión/irritación cutáneas en circunstancias concretas.

Es importante evitar el uso innecesario de animales y reducir al mínimo los ensayos que con toda probabilidad producen respuestas graves en los animales, por su bienestar y por motivos científicos. Antes de considerar la realización de ensayos *in vivo* hay que evaluar toda la información sobre una sustancia en lo que respecta a su posible poder corrosivo/irritativo cutáneo. Puede que existan pruebas suficientes para clasificar el potencial corrosivo o irritativo dérmico de una sustancia analizada, sin necesidad de realizar ensayos con animales de laboratorio. Por eso el uso del análisis de la carga de la prueba y de una estrategia de evaluación secuencial reducirá al mínimo la necesidad de realizar ensayos *in vivo*, especialmente si es probable que la sustancia produzca reacciones graves.

Se recomienda utilizar un análisis de la carga de la prueba para evaluar la información existente sobre el potencial de irritación y corrosión cutáneas producidas por las sustancias, que permitirá determinar si la realización de estudios adicionales, a parte de los cutáneos *in vivo*, ayudaría a caracterizar dicho potencial. Cuando sean necesarios otros estudios, se recomienda utilizar la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos experimentales relevantes. Para sustancias no evaluadas anteriormente, se utilizará la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos necesarios para evaluar su potencial corrosivo/irritativo cutáneo. La estrategia de evaluación que se describe en este Anexo fue desarrollada por un taller de la OCDE (1) y posteriormente confirmada y ampliada por el sistema armonizado integrado de clasificación de peligros para la salud humana y efectos ambientales de las sustancias químicas (*Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*), y fue aprobada en la reunión XXVIII del Comité Conjunto de Productos Químicos (*Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals*) en noviembre de 1998 (2).

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN

Antes de llevar a cabo los ensayos que forman parte de la estrategia de evaluación secuencial (figura), se evaluará toda la información disponible, para determinar la necesidad de practicar estudios cutáneos *in vivo*. Aunque se puede obtener información significativa a partir de la evaluación de parámetros aislados (por ejemplo, un pH extremo), hay que considerar la totalidad de la información existente. Se evaluarán todos los datos relevantes sobre los efectos de la sustancia en cuestión y de sus análogos para tomar una decisión basada en la carga de la prueba, y se presentará la justificación de dicha decisión. Se hará especial hincapié en los datos existentes sobre la sustancia en seres humanos y animales, seguidos por el resultado de los ensayos *in vitro* o *ex vivo*. Siempre que sea posible se evitará realizar estudios *in vivo* con sustancias corrosivas. Los factores que se tienen en cuenta en la estrategia de evaluación son:

Evaluación de datos existentes en seres humanos y en animales (paso 1): En primer lugar se tendrán en cuenta los datos existentes sobre seres humanos, p.ej., estudios clínicos u ocupacionales e informes de casos, y los datos de ensayos realizados con animales, por ejemplo, de estudios sobre toxicidad de la exposición cutánea única o reiterada, pues proporcionan información directamente relacionada con los efectos producidos en la piel. No es necesario someter a estudios *in vivo* a las sustancias irritantes o corrosivas conocidas, ni a las que claramente no son lo uno ni lo otro.

Análisis de las relaciones entre las estructuras (SAR) (paso 2). Hay que tener en cuenta los resultados de los análisis de sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural, si es que existen. Cuando se dispone de suficientes datos en seres humanos o animales sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de dichas sustancias que indique su potencial corrosivo/irritativo cutáneo, se puede presuponer que la sustancia analizada producirá las mismas respuestas. En estos casos puede que no sea necesario evaluar la sustancia en cuestión. Los datos negativos de los estudios sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de éstas no constituyen demostración suficiente de que una sustancia no será corrosiva ni irritante en la estrategia de evaluación secuencial. Para identificar el potencial de corrosión e irritación dérmicas hay que utilizar enfoques SAR validados y aceptados.

Propiedades fisicoquímicas y reactividad química (paso 3). Las sustancias con pH extremos, como $\leq 2,0$ y $\geq 11,5$ pueden tener potentes efectos locales. Si el pH extremo es la base para identificar si una sustancia es corrosiva para la piel, entonces también se tendrá en cuenta la reserva de ácido/álcali (o capacidad amortiguadora) (3)(4). Si la capacidad amortiguadora sugiere la posibilidad de que una sustancia no sea corrosiva para la piel se realizarán más ensayos para confirmarlo, preferiblemente utilizando un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (véanse los pasos 5 y 6).

Toxicidad cutánea (paso 4). Si se demuestra que una sustancia química es muy tóxica por vía cutánea, puede que no sea procedente realizar un estudio sobre irritación/corrosión cutáneas *in vivo*, habida cuenta de que la cantidad de sustancia que se suele aplicar puede superar una dosis muy tóxica, lo que puede matar a los animales o infligirles graves sufrimientos. Además, cuando ya se hayan realizado estudios de toxicidad cutánea en conejos albinos hasta la dosis límites de 2000 mg/kg de peso corporal o más sin que se haya observado irritación ni corrosión cutánea, puede que no sea necesario practicar más ensayos de irritación/corrosión cutáneas. Al evaluar la toxicidad cutánea observada en estudios realizados anteriormente hay que tener en cuenta algunas consideraciones. Por ejemplo, puede que la información publicada sobre las lesiones cutáneas no esté completa. Puede que los ensayos y las observaciones se hayan efectuado en una especie distinta del conejo, y la sensibilidad de las respuestas puede variar mucho de unas especies a otras. También puede que la forma de la sustancia analizada que se aplicó a los animales no sea la adecuada para la evaluación de la irritación/corrosión cutáneas (por ejemplo, disolución de las sustancias para los estudios sobre toxicidad cutánea) (5). Pero cuando se hayan realizado estudios sobre toxicidad cutánea bien diseñados y ejecutados en conejos, los hallazgos negativos pueden constituir prueba suficiente de que la sustancia no es corrosiva ni irritante.

Resultados de los ensayos in vitro o ex vivo (pasos 5 y 6). Cuando se hayan demostrado las propiedades corrosivas o irritantes intensas de una sustancia en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (6) (7) diseñado para la evaluación de estos efectos concretos, no será necesario evaluarla en animales. Se puede dar por supuesto que dichas sustancias producirán similares efectos intensos *in vivo*.

Ensayo in vivo en conejos (pasos 7 y 8). Si a partir de la carga de la prueba se toma la decisión de realizar un ensayo *in vivo*, se empezará con un ensayo inicial con un solo animal. Si los resultados indican que la sustancia es corrosiva para la piel no se realizarán más ensayos. Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más, durante un período de exposición de cuatro horas. Si se observa un efecto irritante en el ensayo inicial el ensayo de confirmación debe hacerse de forma secuencial, o exponiendo a otros dos animales a la vez.

BIBLIOGRAFÍA

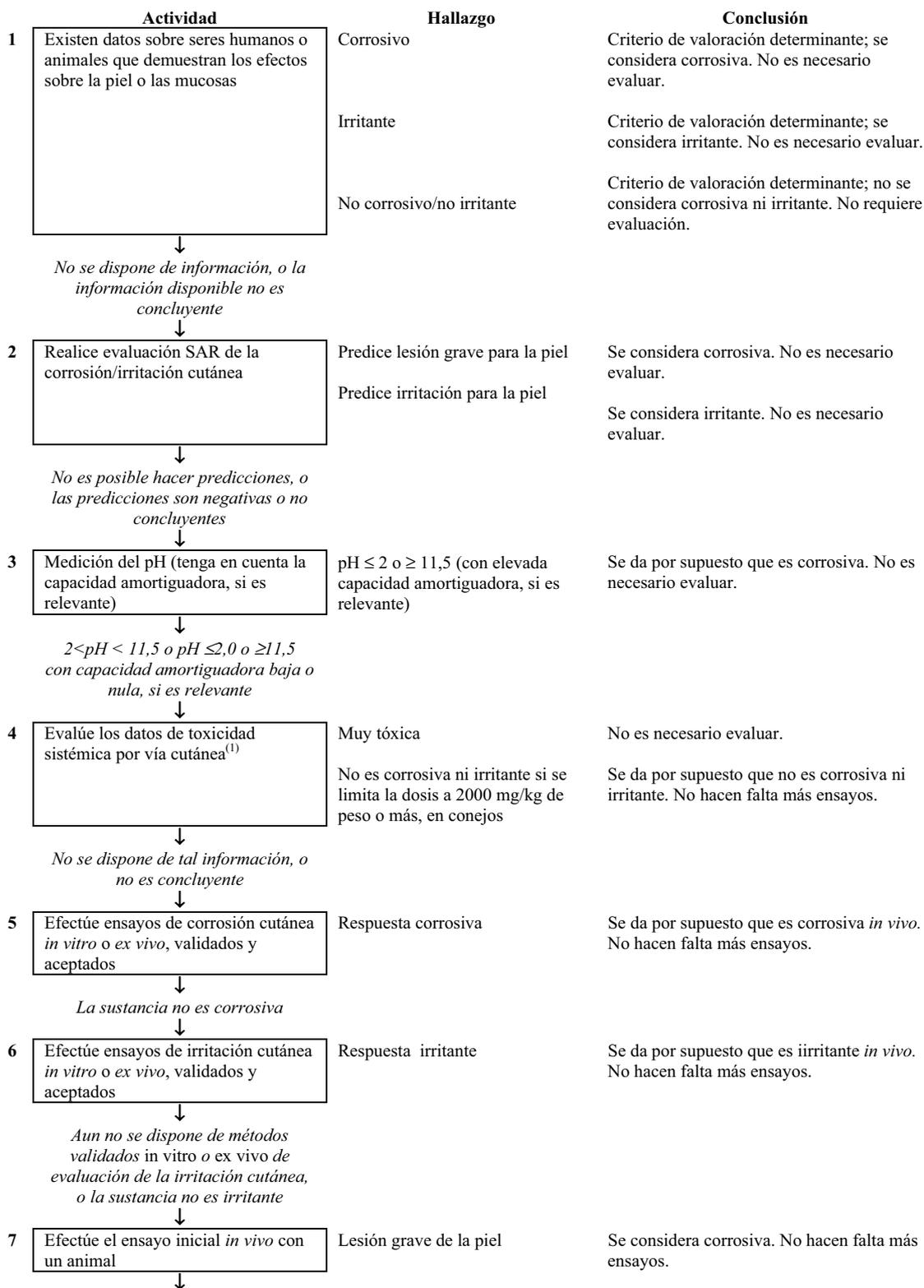
- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/tests/background.htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, **2** (1), 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.

(6) Testing Method B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzthutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483 – 524.

FIGURA

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN / CORROSIÓN CUTÁNEA



⁽¹⁾ Puede considerarse antes de los pasos 2 y 3

No hay lesión grave



8

Realice la prueba de confirmación con uno o dos animales adicionales

Corrosiva o irritante

Se considera corrosiva o irritante. No hacen falta más ensayos.

Ni corrosiva ni irritante

Se considera no corrosiva ni irritante. No hacen falta más ensayos.

ANEXO 2E

B. 5. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR

1. MÉTODO

Este método de evaluación es equivalente al método TG 405 de la OCDE (2002)

1.1 INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de este método actualizado se ha prestado atención especial a las posibles mejoras mediante la evaluación de toda la información existente sobre la sustancia analizada, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias y responder así a la preocupación por el bienestar de los animales. En este método se incluye la recomendación de que antes de llevar a cabo el ensayo *in vivo* que se describe para evaluar la corrosión/irritación ocular aguda de la sustancia, hay que analizar la carga de la prueba (1) que aportan los datos relevantes existentes. Si los datos disponibles son insuficientes se recomienda obtenerlos mediante la aplicación de secuencias de ensayos (2) (3). La estrategia de evaluación recomendada incluye la realización de ensayos *in vitro* validados y aceptados, y se recoge en un anexo de este método. Además se recomienda utilizar un ensayo de irritación/corrosión cutánea *in vivo* para predecir la corrosión ocular antes de realizar un ensayo ocular *in vivo*.

Por interés de la ciencia y del bienestar de los animales no se realizarán ensayos *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos relevantes sobre el potencial de corrosión/irritación ocular de la sustancia en un análisis de la carga de la prueba. Dichos datos incluirán los obtenidos en estudios existentes realizados con seres humanos o con animales de laboratorio, la demostración de corrosión/irritación por parte de una o más sustancias relacionadas estructuralmente o por una mezcla de las mismas, los que demuestran la elevada acidez o alcalinidad de la sustancia (4) (5) y los obtenidos en ensayos de corrosión e irritación cutánea *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados (6) (6a). Los estudios pueden haber sido realizados antes del análisis de la carga de la prueba, o a consecuencia de la misma.

Para ciertas sustancias dicho análisis puede indicar la necesidad de realizar estudios *in vivo* del potencial de corrosión/irritación ocular de la sustancia. En todos esos casos antes de considerar el uso de un ensayo ocular *in vivo* es preferible realizar primero un estudio de los efectos cutáneos *in vivo* de la sustancia, evaluándolo de conformidad con el método de evaluación B.4 (7). La aplicación del análisis de la carga de la prueba y la estrategia de evaluación secuencial debe reducir la necesidad de realizar ensayos *in vivo* de la corrosión/irritación oculares de aquellas sustancias de las que ya se disponga de datos de otros estudios. Si no fuera posible determinar el potencial de corrosión o irritación ocular con la estrategia de evaluación secuencial, ni siquiera tras realizar un estudio *in vivo* de la corrosión y la irritación cutáneas, se podrá llevar a cabo una evaluación de la corrosión/irritación oculares *in vivo*.

En un anexo de este método se recoge el orden recomendado para efectuar los ensayos, incluidos los ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados sobre corrosión e irritación. Se trata de una estrategia desarrollada por un taller de la OCDE, cuyos participantes la recomendaron de manera unánime (8), y ha sido adoptada como estrategia de evaluación recomendada por el sistema armonizado global para la clasificación de sustancias químicas (*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances*, GHS) (9). Aunque dicha estrategia de evaluación secuencial no forma parte integrante del método de evaluación B.4, se recomienda seguirla antes de llevar a cabo ensayos *in vivo*. Para sustancias nuevas, es el nuevo enfoque de evaluación escalonada recomendado para obtener datos científicamente garantizados sobre la corrosión/irritación de la sustancia. Para sustancias existentes con datos insuficientes sobre su corrosión/irritación cutánea y ocular se utilizará la estrategia para obtener los datos que falten. Será necesario justificar el empleo de una estrategia o procedimiento de evaluación diferente, o la decisión de no utilizar un procedimiento escalonado.

1.2 DEFINICIONES

Irritación ocular: alteraciones en el ojo tras la aplicación de una sustancia de ensayo en la superficie anterior del ojo, completamente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación.

Corrosión ocular: lesión tisular en el ojo o grave reducción física de la vista, tras la aplicación de una sustancia de ensayo en la superficie anterior del ojo, que no son completamente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

La sustancia analizada se aplica en una sola dosis a uno de los ojos de un animal de experimentación; el ojo no tratado actúa como control. Se evalúa el grado de irritación/corrosión ocular a intervalos determinados, mediante la puntuación de las lesiones de la conjuntiva, la córnea y el iris. También se describen otros efectos en el ojo y los efectos sistémicos adversos, para proporcionar una evaluación completa de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.

Los animales que muestren signos continuados de deterioro o dolor graves en cualquier fase del ensayo deben ser sacrificados, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Los criterios para sacrificar a los animales moribundos y que sufren intensamente se recogen en la referencia (10).

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

1.4.1 Preparación del ensayo *in vivo*

1.4.1.1 Selección de las especies

El conejo albino es el animal de laboratorio preferido; se emplean individuos adultos jóvenes y sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

1.4.1.2 Preparación de los animales

En las 24 horas previas al inicio del ensayo se examinarán los dos ojos de los animales de experimentación provisionalmente seleccionados para la misma. No se utilizarán animales que muestren irritación ocular, defectos oculares o lesión corneal preexistente.

1.4.1.3 Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales deben ser alojados de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 °C (± 3 °C) para los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30% como mínimo y preferiblemente no superar el 70%, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60%. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber

1.4.2 Procedimiento del ensayo

1.4.2.1 Aplicación de la sustancia analizada

La sustancia analizada debe aplicarse a la conjuntiva de un ojo de cada animal, separando suavemente el párpado del globo ocular. A continuación se juntan suavemente los párpados durante un segundo, para que no se pierda el material. El otro ojo no se trata y sirve como control.

1.4.2.2 Irrigación

No se lavarán los ojos de los animales tratados hasta al menos 24 horas después de la instilación de la sustancia ensayada excepto en el caso de sólidos (véase la sección 1.4.2.3.2) y en caso de producirse efectos corrosivos o irritantes inmediatos. Transcurridas 24 horas se podrán lavar los ojos si se considera necesario.

No se recomienda utilizar un grupo satélite de animales para investigar la influencia del lavado, a menos que esté justificado desde el punto de vista estadístico. Si se necesita un grupo satélite estará formado por dos conejos. Las condiciones del lavado deben quedar minuciosamente documentadas, por ejemplo, hora del lavado; composición y temperatura de la solución de lavado; duración, volumen y velocidad de la aplicación.

1.4.2.3 Nivel de dosis

1.4.2.3.1 Evaluación de líquidos

Para evaluar líquidos se emplea una dosis de 0,1 ml. No se deben utilizar aerosoles para instilar la sustancia directamente en el ojo. Antes de aplicarlo, se expulsa el líquido del aerosol en un recipiente, y se instila 0,1 ml en el ojo.

1.4.2.3.2 Evaluación de sólidos

Para evaluar sólidos, cremas y sustancias con partículas, la cantidad utilizada debe tener un volumen de 0,1 ml o no pesar más de 100 mg. El material analizado debe estar reducido a polvo fino. El volumen de material sólido se medirá tras compactarlo con suavidad, por ejemplo, golpeando suavemente con los dedos el envase medidor. Si en el primer punto temporal de observación (1 hora después del tratamiento) la sustancia analizada sólida no ha sido eliminada del ojo del animal de ensayo por mecanismos fisiológicos, se puede lavar el ojo con suero salino o con agua destilada.

1.4.2.3.3 Evaluación de aerosoles

Se recomienda hacer una recogida de los aerosoles antes de instilar el producto en el ojo. Son excepción las sustancias que van en contenedores en aerosol presurizados, que no se pueden recoger debido a la vaporización. En esos casos hay que sujetar el ojo bien abierto, administrando la sustancia analizada en el ojo con una sola pulverización de un segundo aproximadamente, a una distancia de 10 cm directamente delante del ojo. Esta distancia puede variar dependiendo de la presión del aerosol y de su contenido. Hay que tener cuidado para no lesionar el ojo con la presión del aerosol. En determinados casos puede ser necesario evaluar el potencial de lesión "mecánica" del ojo producida por la fuerza del aerosol.

Es posible calcular la dosis de un aerosol, simulando el ensayo como se indica a continuación: se pulveriza la sustancia sobre papel de pesar, a través de una abertura del tamaño del ojo de un conejo, colocada directamente delante del papel. El aumento de peso del papel sirve para calcular aproximadamente la cantidad administrada al ojo. Para sustancias volátiles se puede calcular la dosis pesando un envase antes de aplicar el material de ensayo y después de retirarlo.

1.4.2.4 Ensayo inicial (ensayo de irritación/corrosión ocular *in vivo* con un animal)

Como ya se ha indicado en la estrategia de evaluación secuencial (véase el Anexo 1), se recomienda encarecidamente realizar el ensayo *in vivo* primero con un solo animal.

Si los resultados de ésta indican que la sustancia es muy irritante o corrosiva en el ojo, no se harán más ensayos.

1.4.2.5 *Anestésicos locales*

El uso de anestésicos locales se considerará caso por caso. Si el análisis de la carga de la prueba indica que la sustancia puede producir dolor, o si la evaluación inicial demuestra que se puede producir una reacción dolorosa, se podrá utilizar un anestésico local antes de aplicar la sustancia en estudio. La elección del tipo, la concentración y la dosis del anestésico local se hará con cuidado, para asegurarse de que su empleo no produce diferencias en la reacción a la sustancia en estudio. El ojo del control debe de recibir la misma anestesia.

1.4.2.6 *Ensayo de confirmación (ensayo de irritación ocular in vivo con animales adicionales)*

Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial, indicativo de un posible efecto potente (irreversible) en la de confirmación, se recomienda efectuar ésta de forma secuencial exponiendo a los animales de uno a uno, en lugar de exponer a dos a la vez. Si el segundo animal presenta efectos corrosivos o irritantes importantes se suspenderá el ensayo. Puede ser necesario utilizar más animales para confirmar respuestas irritantes débiles o moderadas.

1.4.2.7 *Período de observación*

La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la reversibilidad de los efectos observados. No obstante se dará por finalizado el experimento si el cualquier momento el animal presenta signos continuados de dolor o malestar graves (9). Para determinar la reversibilidad de los efectos lo normal es someter a los animales a 21 días de observación a partir de la administración de la sustancia analizada. Si se observa la irreversibilidad antes de 21 días el experimento debe concluir en ese momento.

1.4.2.7.1 *Observaciones clínicas y graduación de las reacciones oculares*

Se examinarán los ojos 1, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de la sustancia analizada. Los animales no permanecerán en el ensayo más tiempo del necesario, una vez obtenida la información definitiva. Los animales que muestren dolor o malestar intenso continuados deben ser sacrificados sin demora, con la consiguiente evaluación de la sustancia. Serán sacrificados los animales que presenten las siguientes lesiones oculares después de la instilación: perforación corneal o ulceración corneal significativa, incluido el estafiloma; presencia de sangre en la cámara anterior del ojo; opacidad corneal de grado 4 que persista durante 48 horas; ausencia de reflejo lumínico (respuesta del iris de grado 2) que persista durante 72 horas; ulceración de la conjuntiva; necrosis de la conjuntiva o de la membrana nictitante, o escarificación. Esto se debe a que tales lesiones no suelen ser reversibles.

Los animales que no presenten lesiones oculares deben permanecer en observación al menos 3 días después de la instilación. Los animales con lesiones leves a moderadas deben permanecer en observación hasta que desaparezcan las lesiones o hasta transcurridos 21 días, que es cuando finaliza el estudio. Las observaciones se efectuarán a los 7, 14 y 21 días, para determinar el estado de las lesiones y si son o no reversibles.

En cada exploración se anotará el grado de reacción ocular (conjuntiva, córnea e iris) (tabla I). También se notificará cualesquiera otras lesiones oculares (por ejemplo, queratitis vascular, manchas oculares) o efectos sistémicos adversos.

Se puede facilitar el examen de las reacciones mediante el uso de una lupa binocular, de una lámpara de hendidura manual, de un biomicroscopio o de otro dispositivo adecuado. Tras registrar las observaciones a las 24 horas, las ulteriores exploraciones pueden hacerse con la ayuda de fluoresceína.

La graduación de las respuestas oculares es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal graduación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado. La graduación de las respuestas oculares debe hacerse en condiciones ciegas.

2. **DATOS**

2.2 **EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Las puntuaciones de la irritación ocular deben evaluarse junto con la naturaleza y la intensidad de las lesiones, y el hecho de si son reversibles o no. Las puntuaciones individuales no constituyen una referencia absoluta de la propiedades irritativas del material, pues también se evalúan otros efectos del material evaluado. En su lugar las puntuaciones individuales deben considerarse como valores de referencia, que sólo serán significativos cuando sean respaldados por una descripción completa y la evaluación de todas las demás observaciones.

3. **NOTIFICACIÓN**

3.1 **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo incluirá la siguiente información:

Justificación del ensayo *in vivo*: análisis de la carga de la prueba de ensayos realizados anteriormente, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial.

— descripción de datos relevantes de ensayos realizados anteriormente:

— datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación:

— descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos los resultados obtenidos con las sustancias analizadas/de referencia:

— descripción del estudio sobre irritación/corrosión cutánea *in vivo* realizado, con los resultados obtenidos;

— análisis de la carga de la prueba para realizar el estudio *in vivo*.

Sustancia analizada:

- datos de identificación (por ejemplo, número CAS; origen; pureza; impurezas conocidas; número de lote);
- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo pH, volatilidad, solubilidad, estabilidad, reacción en agua);
- si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de los componentes.
- si se utiliza anestésico local, identificación, pureza, tipo, dosis y posible interacción con la sustancia analizada.

Vehículo:

- identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado;
- justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

- especie/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos;
- edad de cada animal al principio del estudio;
- número de animales de cada sexo en los grupos de prueba y de control (en su caso);
- peso de los animales individuales al principio y al final del ensayo;
- origen de los animales, condiciones del alojamiento, dieta, etc.

Resultados:

- descripción del método utilizado para puntuar la irritación en cada momento de observación (por ejemplo, lámpara de hendidura manual, biomicroscopio, fluoresceína);
- tabulación de los datos de respuesta irritante/corrosiva de cada animal en cada momento de observación, hasta la retirada de cada animal del ensayo;
- descripción narrativa del grado y la naturaleza de la irritación o la corrosión observadas;
- descripción de otras lesiones observadas en el ojo (por ejemplo vascularización, queratitis vascular, adherencias, manchas);
- descripción de efectos adversos locales no oculares y sistémicos, y hallazgos histopatológicos, en su caso.

Comentario de los resultados

3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La extrapolación a humanos de los resultados de los estudios de irritación ocular realizados con animales de laboratorio sólo es válida en cierto grado. En muchos casos, los conejos albinos son más sensibles a los irritantes o corrosivos oculares que los seres humanos.

Hay que interpretar con cuidado los datos para excluir la irritación resultante de una infección secundaria.

4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Barrette, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 - 429.
- (2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol. 35, 159 - 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 - 231.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483 - 524.
- (6a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- (7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion.
- (8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pronunciado en Solna, Suecia, 22 - 24 de enero de 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviembre de 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

TABLA I: GRADUACIÓN DE LAS LESIONES OCULARES

Córnea

Opacidad: grado de densidad (se tendrá en cuenta la zona más densa)*

| | |
|--|---|
| Sin ulceración ni opacidad | 0 |
| Zonas de opacidad diseminadas o difusas (aparte del ligero mate debido a la limpieza habitual); los detalles del iris se aprecian con claridad | 1 |
| Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos | 2 |
| Zona nacarada; no se ven detalles del iris; el tamaño de la pupila apenas es discernible | 3 |
| Córnea opaca; no se distingue el iris a su través. | 4 |

Máximo posible 4

*Hay que tomar nota de la superficie de la opacidad corneal

Iris

| | |
|---|---|
| Normal..... | 0 |
| Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o inyección circuncorneal; iris reactivo a la luz (si la reacción es defectuosa se considera como efecto):..... | 1 |
| Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz | 2 |

Máximo posible 2

Conjuntiva

| | |
|--|---|
| Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar; se excluye la córnea y el iris) Normal..... | 0 |
| Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyectados) | 1 |
| Coloración carmesí difusa; no se distinguen fácilmente los vasos individuales | 2 |
| Coloración carne difusa | 3 |

Máximo posible 3

Quemosis

Inflamación (se refiere a los párpados o a las membranas nictitantes)

| | |
|---|---|
| Normal..... | 0 |
| Cierta hinchazón superior a lo normal | 1 |
| Hinchazón evidente con eversión parcial de los párpados | 2 |
| Hinchazón con párpados medio cerrados | 3 |
| Hinchazón con párpados más que medio cerrados | 4 |

Máximo posible 4

ANEXO

Estrategia de evaluación secuencial de la irritación y la corrosión oculares

CONSIDERACIONES GENERALES

Es importante evitar el uso innecesario de animales y reducir al mínimo las pruebas que con toda probabilidad produce respuestas graves en los animales, por su bienestar y por motivos científicos. Antes de considerar la realización de ensayos *in vivo* hay que evaluar toda la información sobre una sustancia en lo que respecta a su posible poder corrosivo/irritativo ocular. Puede que existan pruebas suficientes para clasificar el potencial corrosivo o irritativo ocular de una sustancia analizada,

sin necesidad de realizar ensayos con animales de laboratorio. Por eso el uso del análisis de la carga de la prueba y de una estrategia de evaluación secuencial reducirá al mínimo la necesidad de realizar ensayos *in vivo*, especialmente si es probable que la sustancia produzca reacciones graves.

Se recomienda utilizar el análisis de la carga de la prueba para evaluar la información existente sobre el potencial de irritación y corrosión oculares producidas por las sustancias, para determinar si la realización de estudios adicionales, a parte de los oculares *in vivo*, ayudaría a caracterizar dicho potencial. Cuando sean necesarios otros estudios, se recomienda utilizar la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos experimentales relevantes. Para sustancias no evaluadas anteriormente, se utilizará la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos necesarios para evaluar su potencial corrosivo/irritativo ocular. La estrategia de evaluación que se describe en este Anexo fue redactada en un taller de la OECD (1). Posteriormente fue confirmada y ampliada por el sistema armonizado integrado de clasificación de peligros para la salud humana y efectos ambientales de las sustancias químicas (*Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*), y fue aprobada en la 1 XXVIII reunión del Comité Conjunto para productos químicos (*Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals*) en noviembre de 1998 (2).

Aunque la presente estrategia de evaluación no forma parte integrante del método de evaluación B.5, sí expresa el enfoque recomendado para la determinación de las características de irritación/corrosión oculares. Este enfoque representa la práctica óptima y una piedra angular desde el punto de vista ético para el análisis *in vivo* de la irritación/corrosión oculares. El método de evaluación proporciona instrucciones para la realización del ensayo *in vivo*, y resume los factores que se han de abordar antes de ponerla en marcha. La estrategia proporciona un enfoque basado en la carga de la prueba para la evaluación de los datos existentes sobre las propiedades de irritación/corrosión oculares de las sustancias analizadas, y un enfoque por partes para generar datos relevantes sobre sustancias que necesitan estudios adicionales o que no han sido estudiadas. La estrategia incluye la realización en primer lugar de ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados y a continuación del método de evaluación B.4 estudios de irritación/corrosión cutánea en condiciones concretas (3) (4).

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN ESCALONADA

Antes de llevar a cabo los ensayos que forman parte de la estrategia de evaluación secuencial (figura), se evaluará toda la información disponible, para determinar la necesidad de practicar estudios oculares *in vivo*. Aunque se puede obtener información significativa a partir de la evaluación de parámetros aislados (por ejemplo, un pH extremo), hay que considerar la totalidad de la información existente. Se evaluarán todos los datos relevantes sobre los efectos de la sustancia en cuestión y de sus análogos estructurales, para tomar una decisión basada en la carga de la prueba, y se presentará la justificación de dicha decisión. Se hará especial hincapié en los datos existentes sobre la sustancia en seres humanos y animales, seguidos por el resultado de los ensayos *in vitro* o *ex vivo*. Siempre que sea posible se evitará realizar estudios *in vivo* con sustancias corrosivas. Los factores que se tienen en cuenta en la estrategia de evaluación son:

Evaluación de datos existentes en seres humanos y en animales (paso 1): En primer lugar se tendrán en cuenta los datos existentes sobre seres humanos, p.ej., estudios clínicos u ocupacionales e informes de casos, y los datos de ensayos realizados con animales en estudios oftalmológicos, pues proporcionan información directamente relacionada con los efectos producidos en los ojos. A continuación se evaluarán los datos disponibles de estudios realizados con seres humanos o animales para investigar la corrosión/irritación cutáneas. Las sustancias conocidas por ser corrosivas o intensamente irritantes para el ojo no se aplicarán a los ojos de los animales, ni tampoco aquéllas que tengan efectos corrosivos o irritantes para la piel; dichas sustancias debe ser consideradas corrosivas o irritantes para los ojos también. Cuando en estudios oftalmológicos realizados anteriormente se hayan obtenido pruebas suficientes de que una sustancia no es corrosiva ni irritante, tampoco será sometida a estudios oftalmológicos *in vivo*.

Análisis de las relaciones entre las estructuras (SAR) (paso 2): Hay que tener en cuenta los resultados de los análisis de sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural, si es que existen. Cuando se dispone de suficientes datos en seres humanos o animales sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de dichas sustancias que indique su potencial corrosivo/irritativo ocular, se puede presuponer que la sustancia analizada producirá las mismas respuestas. En estos casos puede que no sea necesario evaluar la sustancia en cuestión. Los datos negativos de los estudios sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de éstas no constituyen demostración suficiente de que una sustancia no será corrosiva ni irritante en la estrategia de evaluación secuencial. Para identificar el potencial de corrosión e irritación dérmica y ocular hay que utilizar enfoques SAR validados y aceptados.

Propiedades fisicoquímicas y reactividad química (paso 3): Las sustancias con pH extremos, como $\leq 2,0$ y $\geq 11,5$ pueden tener potentes efectos locales. Si el pH extremo es la base para identificar si una sustancia es corrosiva o irritante para el ojo, entonces también se tendrá en cuenta la reserva de ácido/álcali (o capacidad amortiguadora) (3)(4). Si la capacidad amortiguadora sugiere la posibilidad de que una sustancia no sea corrosiva para el ojo se realizarán mas pruebas para confirmarlo, preferiblemente utilizando un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (véanse los pasos 5 y 6).

Consideración de otras informaciones existentes (paso 4): En esta fase se evaluará toda la información disponible sobre la toxicidad sistémica por vía cutánea. También se tendrá en cuenta la toxicidad cutánea aguda de la sustancia analizada. Si se ha demostrado que la sustancia es muy tóxica por vía cutánea puede no ser necesario estudiarla en el ojo. Aunque no existe necesariamente una relación entre la toxicidad cutánea aguda y la irritación/corrosión ocular, se puede suponer que si un agente es muy tóxico por vía cutánea también lo será si se aplica al ojo. Estos datos también se pueden tener en cuenta entre los pasos 2 y 3.

Resultados de los ensayos in vitro o ex vivo (pasos 5 y 6): Cuando se hayan demostrado las propiedades corrosivas o irritativas intensas de una sustancia en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* (7) (8) validado y aceptado para la evaluación concreta de la corrosión/irritación ocular o cutánea, no será necesario evaluarla en animales. Se puede dar por supuesto que dichas sustancias producirán similares efectos intensos *in vivo*. Si no se dispone de ensayos *in vitro/ex vivo* validados y aceptados, debe prescindirse de los pasos 5 y 6 y pasar directamente al paso 7.

Evaluación del poder irritante cutáneo in vivo de la sustancia (paso 7): Cuando sean insuficientes los datos para realizar un análisis de la carga de la prueba concluyente sobre el poder irritante/corrosivo ocular de una sustancia a partir de los datos de los estudios que se han enumerado, se procederá en primer lugar a evaluar el potencial de irritación/corrosión cutánea *in vivo*, utilizando el método de evaluación B.4 (4) y el Anexo que le acompaña (9). Si se demuestra que la sustancia produce corrosión o irritación cutánea intensa, se considerará como corrosiva para el ojo, a menos que haya otros datos en apoyo de otra conclusión. En ese caso no será necesario realizar un ensayo ocular *in vivo*. Si la sustancia no es corrosiva ni intensamente irritante para la piel, se realizará un ensayo cutáneo *in vivo*.

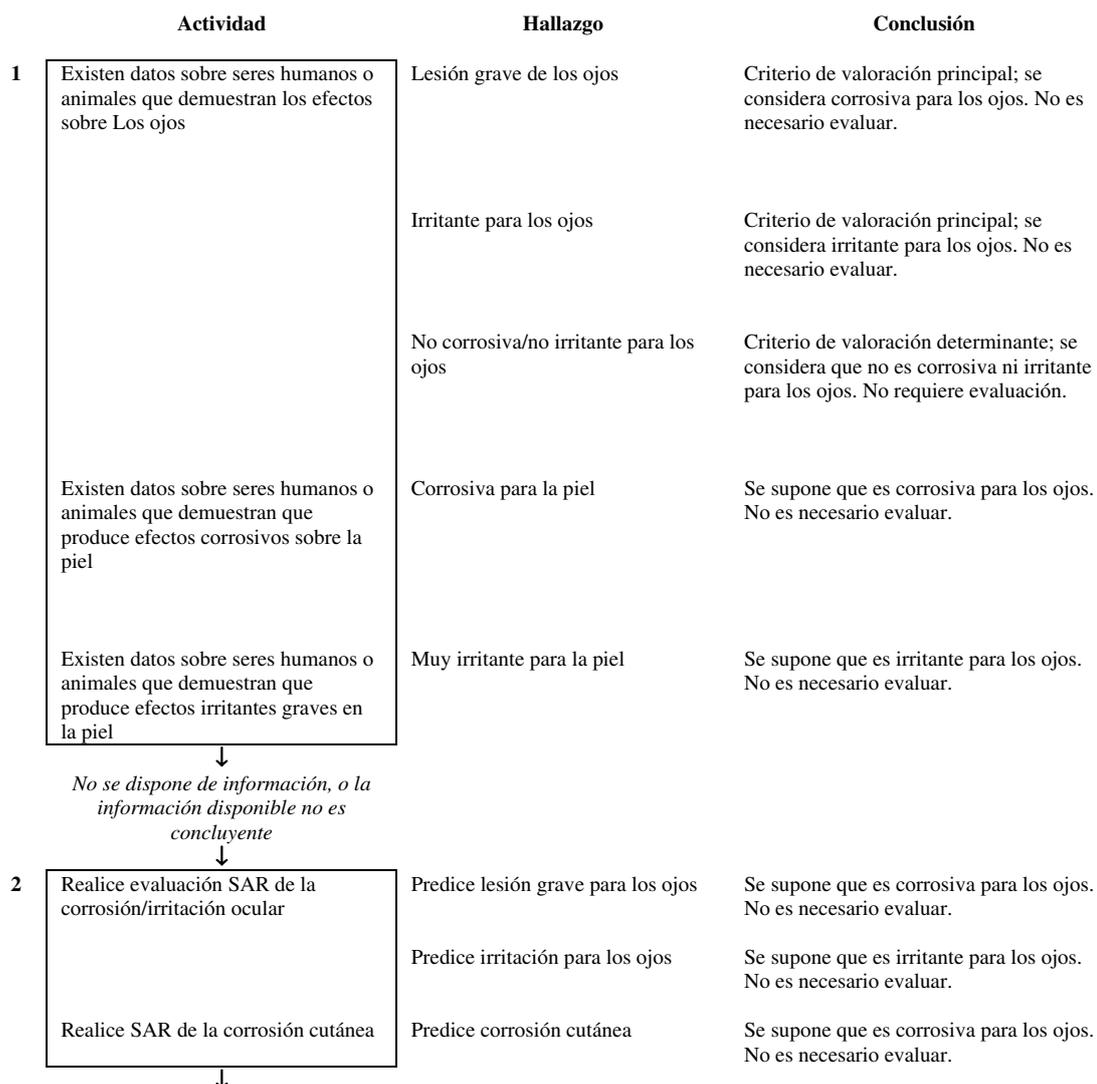
Ensayo in vivo en conejos (pasos 8 y 9): El ensayo ocular *in vivo* empezará con un ensayo inicial con un solo animal Si los resultados de ésta indican que la sustancia es muy irritante o corrosiva en el ojo, no se harán más ensayos. Si dicho ensayo no muestra efectos corrosivos ni irritantes graves, se llevará a cabo un ensayo de confirmación con otros dos animales.

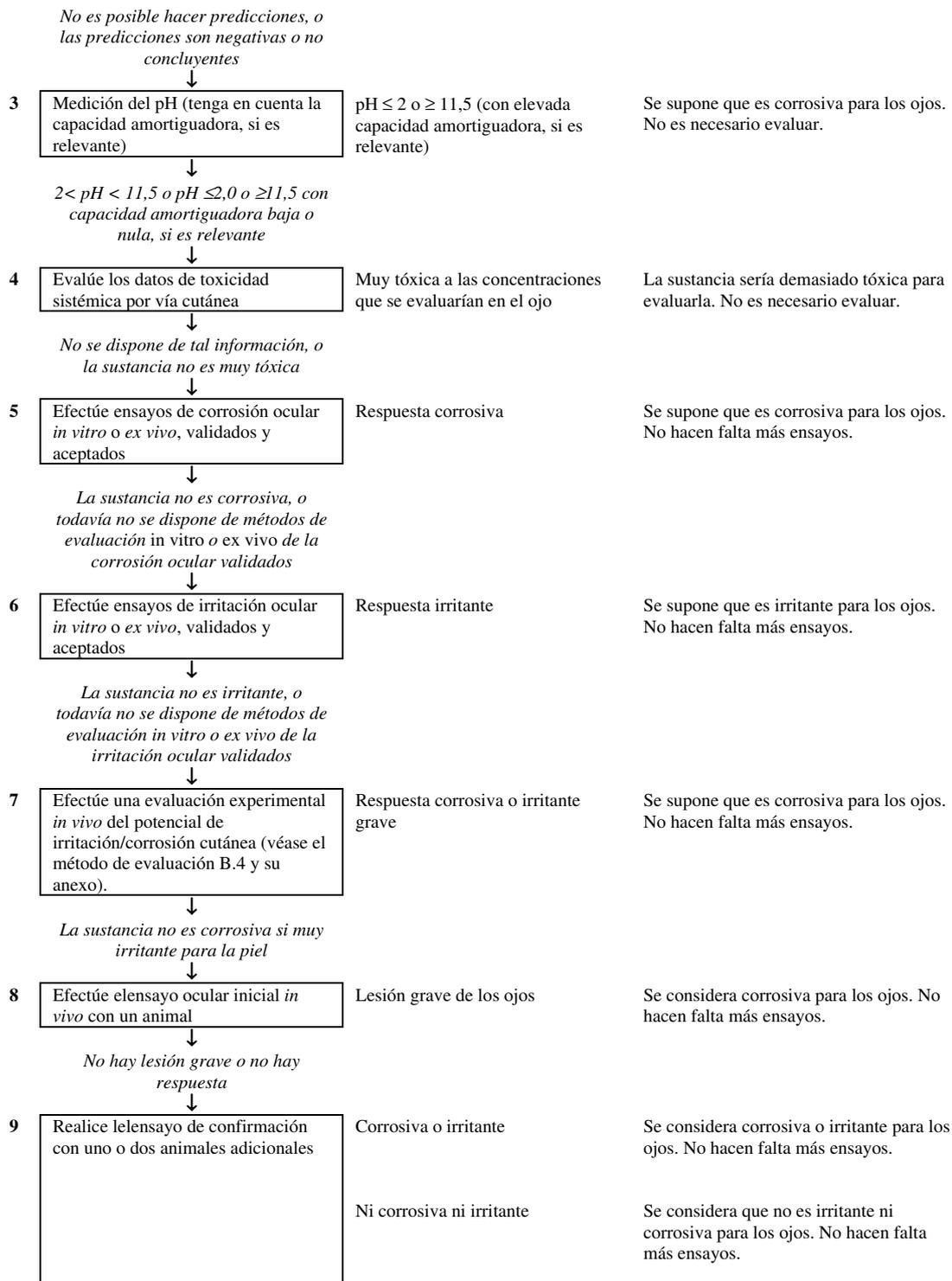
BIBLIOGRAFÍA

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pronunciado en Solna, Suecia, 22 - 24 de enero de 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviembre de 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA* 27, 161-177.
- (4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227 - 231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, 483 – 524.
- (8) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- (9) Annex to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

FIGURA

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN / CORROSIÓN OCULAR





ANEXO 2F

B.31. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA EL DESARROLLO PRENATAL

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 414 (2001).

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad para el desarrollo tiene por objeto proporcionar información general sobre los efectos de la exposición prenatal en la hembra grávida sometida a ensayo y en el organismo intrauterino en desarrollo; incluye, en particular, la evaluación de los efectos sobre la madre, así como la muerte, anomalías estructurales y alteraciones del crecimiento del feto. Pese a que las deficiencias funcionales constituyen un aspecto importante del crecimiento, no se contemplan en el presente método de ensayo. Pueden investigarse al margen o como complemento de este método en un estudio de neurotoxicidad para el desarrollo. Éste último y el estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones pueden emplearse para detectar deficiencias funcionales y otros efectos postnatales.

En algunos casos particulares, puede ser necesario adaptar el protocolo de este ensayo, en función, por ejemplo, de las propiedades fisicoquímicas o toxicológicas de la sustancia de ensayo. La adaptación será aceptable si se dispone de datos científicos convincentes que indiquen que de esa manera el ensayo proporcionará mayor información. En tal caso, esos datos científicos deberán incluirse minuciosamente en el informe del ensayo.

1.2 DEFINICIONES

Toxicología del desarrollo: estudio de los efectos adversos sobre un organismo en desarrollo, que pueden producirse tras la exposición antes de la concepción y durante el desarrollo prenatal y postnatal hasta la maduración sexual. Los principales signos de la toxicidad para el desarrollo son la muerte del organismo, las anomalías estructurales, la alteración del crecimiento y las deficiencias funcionales. Antiguamente, la toxicología del desarrollo solía denominarse teratología.

Efecto adverso: toda alteración respecto a una situación de referencia, relacionada con el tratamiento, que disminuya la capacidad del organismo para sobrevivir, reproducirse o adaptarse al entorno. La toxicología del desarrollo, considerada en su sentido más amplio, incluye todos los efectos que afectan al desarrollo normal del producto de la concepción, antes y después del nacimiento.

Alteración del crecimiento: alteración que afecte al peso o el tamaño del cuerpo o los órganos de la descendencia.

Alteraciones (anomalías): alteraciones estructurales en el desarrollo, que incluyen las malformaciones y las variaciones (28).

Malformación/anomalía grave: cambio estructural que se considere perjudicial (también puede resultar letal) para el animal y, por lo general, infrecuente.

Variación/anomalía leve: cambio estructural que se considere poco o nada perjudicial para el animal; puede tener carácter transitorio y ser relativamente frecuente en la población de control.

Producto de la concepción: conjunto de los derivados de un óvulo fecundado, en cualquier fase del desarrollo, desde la fecundación hasta el nacimiento, incluidas las membranas extraembrionarias y el embrión o el feto.

Implantación (anidación): fijación del blastocisto en la túnica epitelial del útero, que incluye la penetración por el epitelio uterino y la inserción en el endometrio.

Embrión: primera fase del desarrollo de un organismo, en particular, la fase de desarrollo de un huevo fecundado desde que aparece el eje mayor hasta que quedan representadas las estructuras principales.

Embriotoxicidad: nocividad para la estructura, el desarrollo, el crecimiento y/o la viabilidad normales de un embrión.

Feto: descendencia nonata en el período postembrionario.

Fetotoxicidad: nocividad para la estructura, el desarrollo, el crecimiento y/o la viabilidad normales de un feto.

Aborto: expulsión prematura del útero de los productos de la concepción (embrión o feto no viable).

Resorción: absorción de un producto de la concepción que muere una vez implantado en el útero.

Resorción precoz: signos de implantación sin embrión ni feto reconocible.

Resorción tardía: embrión o feto muerto, que presenta cambios degenerativos externos.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis o grado de exposición más alto al que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3 SUSTANCIA DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Por lo general, se administra la sustancia de ensayo a las hembras grávidas al menos desde la implantación hasta la víspera del sacrificio, que debe llevarse a cabo tan cerca como sea posible de la fecha probable del parto, pero no demasiado tarde, para evitar la pérdida de datos en caso de parto prematuro. El método de ensayo no se refiere únicamente al período de la organogénesis (del 5º al 15º día en los roedores y del 6º al 18º en el conejo), sino que estudia asimismo los efectos a lo largo de toda la gestación, desde la fase previa a la implantación, en su caso, hasta la víspera de la cesárea. Las hembras se sacrifican poco antes de la cesárea. Se estudia el contenido uterino y se examinan los fetos para detectar las anomalías externas visibles y los cambios en los tejidos blandos y el esqueleto.

1.5 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.5.1 Selección de la especie animal

Se recomienda realizar el ensayo con la especie más adecuada y utilizar las especies y cepas de laboratorio más comunes en los ensayos de toxicidad para el desarrollo prenatal. El roedor idóneo es la rata y, entre los no roedores, el conejo. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

1.5.2 Alojamiento y alimentación

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C ($\pm 3^\circ$) en el caso de los roedores y de 18 °C ($\pm 3^\circ$) en el caso de los conejos, y con una humedad relativa mínima del 30 % y preferiblemente inferior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, si bien lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se proporciona una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad.

El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas. Si bien es preferible colocar a los animales apareados en jaulas individuales, también pueden alojarse en grupos reducidos.

1.5.3 Preparación de los animales

Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. El peso y la edad de los animales de experimentación debe ser lo más uniforme posible en todos los lotes de ensayo. Deben emplearse hembras adultas jóvenes y nulíparas para cada dosis. Las hembras han de aparearse con machos de la misma especie y cepa y debe evitarse el apareamiento entre animales hermanos. En el caso de los roedores, el día 0 de la gestación es el día en que se observa un tapón vaginal y/o la presencia de semen; en el caso de los conejos, suele ser el día del coito o de la inseminación artificial, si se emplea esta técnica. Las hembras apareadas se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto. Si el apareamiento se efectúa por grupos, los animales de un mismo grupo se repartirán de forma uniforme entre los distintos lotes. Asimismo, las hembras inseminadas por un mismo macho se repartirán de manera uniforme entre los lotes.

1.6 PROCEDIMIENTO

1.6.1 Número y sexo de los animales

Cada lote de ensayo y de control deberá estar integrado por una cantidad de hembras que permita practicar la autopsia de unos 20 ejemplares que presenten puntos de implantación. Los lotes de menos de 16 hembras con puntos de implantación pueden resultar inadecuados. La mortalidad materna no invalida necesariamente el estudio, siempre y cuando no supere el 10 % aproximadamente.

1.6.2 Preparación de las dosis

Si se emplea un aditivo u otro vehículo para facilitar la dosificación, deberán tenerse presentes los efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo y retención o excreción de la sustancia de ensayo, los efectos sobre las propiedades químicas de ésta que puedan modificar su toxicidad, y los efectos sobre el consumo de alimentos y agua y sobre el estado nutricional de los animales. El vehículo no debe ser tóxico para el desarrollo ni afectar a la reproducción.

1.6.3 Posología

Por lo general, la sustancia de ensayo se administra todos los días desde la implantación (por ejemplo, el quinto día después del apareamiento) hasta la víspera del día en que esté prevista la cesárea. Si los estudios preliminares disponibles no señalan un riesgo elevado de pérdidas preimplantatorias, puede administrarse el tratamiento durante todo el período de gestación, desde el apareamiento hasta la víspera de la cesárea. Se sabe que el estrés y la manipulación indebida durante la gestación pueden ocasionar pérdidas prenatales. Con objeto de evitar las pérdidas prenatales independientes del tratamiento, debe evitarse la manipulación innecesaria de las hembras grávidas y el estrés debido a factores externos como el ruido.

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los animales sanos se distribuyen al azar entre el lote de control y los lotes de ensayo. Las dosis han de ser progresivas para obtener una gradación de efectos tóxicos. A menos que las características fisicoquímicas o las propiedades biológicas de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos para el desarrollo y/o en la madre (signos clínicos o disminución del peso corporal), pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Al menos una dosis intermedia debe producir los efectos tóxicos mínimos observables. La dosis mínima no debe resultar tóxica en absoluto para la madre ni para el desarrollo. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis y la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si bien es cierto que se trata de determinar la NOAEL en la madre, los estudios que no permiten determinarla también son aceptables (1).

Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad y la información complementaria relativa al metabolismo y la toxicocinética de la sustancia de ensayo o productos afines. Dicha información servirá asimismo para justificar la pertinencia de la gama de dosis.

Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia de ensayo, pero sí el vehículo en caso de que éste se utilice para la sustancia. Debe administrarse el mismo volumen de sustancia de ensayo o de vehículo a todos los lotes. Los animales del lote o lotes de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Los lotes de control a los que se administra el vehículo han de recibir el mayor volumen que se haya utilizado (el que se administre al lote tratado con la dosis inferior).

1.6.4 **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1000 mg/kg peso corporal/día, administrada por vía oral y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio no se produce ningún efecto tóxico observable en las hembras grávidas ni en la progenie y si, a la luz de los datos disponibles (por ejemplo, sobre sustancias con características estructurales y/o metabólicas similares), no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Según el grado previsto de exposición humana, puede ser preciso administrar una dosis oral superior en el ensayo límite. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo las que determinan y limitan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse (por ejemplo, la aplicación cutánea no debe producir toxicidad local grave).

1.6.5 **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo y el vehículo suelen administrarse mediante intubación oral. Si se opta por otra vía de administración, deberá motivarse y justificarse, y procederse a las modificaciones pertinentes (2)(3)(4). La sustancia de ensayo debe administrarse todos los días a la misma hora más o menos.

Por lo general, la dosis que se administra a cada animal se calcula con arreglo a la última determinación del peso corporal, si bien conviene ser prudente al adaptar la dosis en el último período de la gestación. Debe considerarse la información disponible para seleccionar la dosis de manera que se evite una toxicidad excesiva para la madre. Si, a pesar de todo, se observa una toxicidad excesiva en las madres tratadas, deberán sacrificarse por métodos compasivos. Si varias hembras grávidas presentan signos de toxicidad excesiva, se contemplará la posibilidad de sacrificar todo el lote tratado con esa dosis. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal y no debe superar 1 ml/100g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100g de peso corporal. En caso de que se emplee aceite de maíz como vehículo, el volumen no debe superar 0,4 ml/100g de peso corporal. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

1.6.6 **Observación de las madres**

Las observaciones clínicas y el correspondiente registro deben efectuarse al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales y, en particular, los animales muertos o moribundos, las alteraciones pertinentes del comportamiento y todos los signos de toxicidad manifiesta.

1.6.7 **Peso corporal y consumo de alimentos**

Los animales deben pesarse el día 0 de la gestación o, a más tardar, el día 3 si se trata de animales ya apareados procedentes de un criador externo; a continuación, el primer día de tratamiento, al menos cada tres días durante el período de administración y, por último, el día del sacrificio.

Se registra el consumo de alimentos cada tres días, coincidiendo con los días en que se pesen los animales.

1.6.8 **Autopsia**

Se sacrifican las hembras la víspera del día previsto para el parto. Aquéllas que presenten signos de aborto o parto prematuro antes de la fecha en que esté previsto darles muerte serán sacrificadas y sometidas a un examen macroscópico exhaustivo.

Tras el sacrificio o la muerte en el transcurso del estudio, las hembras se someten a un examen macroscópico para detectar cualquier cambio patológico o anomalía estructural. Con objeto de minimizar los sesgos, es preferible efectuar la observación de las madres durante la cesárea y el examen posterior del feto sin conocer la dosis administrada.

1.6.9 Examen del contenido uterino

Inmediatamente después del sacrificio o tan pronto como sea posible tras la muerte del animal, se extrae el útero y se comprueba el estado de gravidez. También se examinarán los úteros que no parezcan grávidos (por ejemplo, mediante tinción de sulfuro amónico en el caso de los roedores y tinción de Salewski u otro método adecuado, en el de los conejos) para confirmar la ausencia de gravidez (5).

Se pesan los úteros grávidos con el cuello, salvo los de las hembras que hayan muerto durante el estudio.

Se cuenta el número de cuerpos amarillos en las hembras grávidas.

Se examina el contenido uterino para determinar el número de embriones o fetos muertos y de fetos viables. Es preciso describir el grado de resorción para calcular la fecha aproximada de la muerte del producto de la concepción (véase el apartado 1.2).

1.6.10 Examen de los fetos

Se determina el sexo y el peso corporal de cada feto.

Se examinan todos los fetos para ver si presentan alteraciones externas (6).

Se ve, asimismo, si presentan alteraciones del esqueleto o los tejidos blandos (por ejemplo, variaciones y malformaciones o anomalías) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Es aconsejable, pero no indispensable, clasificar las alteraciones fetales. Si se efectúa la clasificación, deben establecerse claramente los criterios que definen cada clase. Se estudiará detenidamente si ha habido alteraciones en el desarrollo del tracto genital.

En el caso de los roedores, se prepara aproximadamente la mitad de cada camada para estudiar las alteraciones del esqueleto. El resto se prepara para el estudio de las alteraciones de los tejidos blandos, que se efectuará en cortes seriados realizados por métodos reconocidos o apropiados o mediante técnicas finas de disección macroscópica.

Si se han empleado no roedores, por ejemplo conejos, todos los fetos se someten a examen para detectar posibles alteraciones de los tejidos blandos y el esqueleto. Se diseccionan cuidadosamente los cuerpos de los fetos para buscar alteraciones de los tejidos blandos; esta operación puede incluir técnicas que permitan examinar más exhaustivamente la estructura cardíaca interna (25). Se toman las cabezas de la mitad de los fetos analizados de esta manera y se preparan para evaluar las alteraciones de los tejidos blandos (en particular, ojos, cerebro, conductos nasales y lengua), mediante técnicas clásicas de cortes seriados (26) u otro método que presente la misma sensibilidad. Se preparan los cuerpos de esos fetos y los de los fetos intactos restantes para el estudio de las alteraciones del esqueleto mediante los métodos descritos para los roedores.

2 RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada madre y su prole y resumirse en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio compasivo, el número de hembras grávidas, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de observaciones de los embriones o fetos y todos los datos pertinentes sobre la camada.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado, tomando la camada como unidad para el análisis de los datos. La elección de los métodos estadísticos debe efectuarse en la fase de diseño del estudio y justificarse. Deben registrarse también los datos relativos a los animales que no sobrevivan hasta la fecha programada para el sacrificio y, si procede, pueden incluirse en las medias de los lotes. La pertinencia de dichos datos y, por tanto, la decisión de incluirlos o no en las medias de los lotes, debe valorarse caso por caso y justificarse.

2.2 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal deben evaluarse respecto a los efectos observados. La evaluación debe incluir la información siguiente:

- resultados de los ensayos en las madres y los embriones o fetos, incluida la evaluación de la relación, o la ausencia de relación, entre la exposición de los animales a la sustancia de ensayo y la incidencia y gravedad de todos los efectos observados;
- criterios aplicados, en su caso, para clasificar las alteraciones fetales externas, de los tejidos blandos y del esqueleto;
- si procede, datos previos relativos a los controles para afinar la interpretación de los resultados del estudio;
- cifras empleadas en el cálculo de todos los índices o porcentajes;
- análisis estadístico apropiado de los resultados del estudio e inclusión de información suficiente sobre el método empleado, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluarlo y reconstruirlo;

Si el estudio no pone de manifiesto ningún efecto tóxico, debe valorarse la pertinencia de efectuar experimentos complementarios para determinar la absorción y la biodisponibilidad de la sustancia de ensayo.

2.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los estudios de toxicidad para el desarrollo prenatal proporcionan información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia administrada durante la gravidez en las madres y en el desarrollo intrauterino de su prole. Los resultados del estudio han de interpretarse a la luz de los de los estudios de toxicidad subcrónica, reproducción, toxicocinéticos y de otro tipo. Dado que el estudio se centra tanto en la toxicidad general para la madre como en la toxicidad para el desarrollo, los resultados permiten distinguir en cierta medida los efectos sobre el desarrollo que se producen en ausencia de toxicidad general de los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para la madre (27).

3 INFORME

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

- naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas;
- identificación, incluido el número CAS si se conoce;
- pureza.

Vehículo (si procede):

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

- especie y cepa empleada;
- número y edad de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

- justificación de la elección de las dosis;
- datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;
- datos de la administración de la sustancia de ensayo;
- factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede;
- condiciones ambientales;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados:

Datos relativos a la toxicidad para la madre en función de las dosis, indicando al menos lo siguiente:

- número de animales al principio del ensayo, número de animales supervivientes, número de hembras grávidas, número de abortos y número de partos prematuros;
- fecha de las muertes sobrevenidas durante el ensayo y número de animales que han sobrevivido hasta el sacrificio;
- datos sobre los animales que no hayan sobrevivido hasta el sacrificio, y no incluidos en las comparaciones estadísticas entre lotes;
- día de la observación de cada signo clínico anómalo y evolución posterior;
- peso corporal, variación del mismo y peso del útero grávido, con inclusión facultativa de la variación del peso corporal corregida en función del peso del útero grávido;
- consumo de alimentos y de agua, si se ha medido;
- hallazgos de la autopsia, incluido el peso uterino;
- NOAEL relativas a los efectos sobre la madre y sobre el desarrollo.

Datos relativos al desarrollo por dosis y camada (con implantaciones), en particular:

- número de cuerpos amarillos;
- número de implantaciones, número y porcentaje de fetos vivos y muertos y número de resorcciones;
- número y porcentaje de pérdidas pre y postimplantatorias.

Datos relativos al desarrollo por dosis y camada (con fetos vivos), en particular:

- número y porcentaje de crías vivas;
- proporción de machos y hembras;
- peso corporal de los fetos, preferiblemente por sexo y sin distinción por sexo;
- malformaciones externas, de los tejidos blandos y el esqueleto y otras alteraciones pertinentes;
- criterios de clasificación, si procede;
- número total y porcentaje de fetos y de camadas que presenten alguna alteración externa, de los tejidos blandos o el esqueleto; tipos e incidencia de cada anomalía y demás alteraciones pertinentes.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
- (2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.
- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292.

ANEXO 2G

B.35. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 416 (2001).

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones tiene por objeto proporcionar información general sobre los efectos de una sustancia de ensayo en la integridad y funcionamiento del aparato reproductor del macho y la hembra, en particular, la función gonadal, ciclo estrual, comportamiento relativo al apareamiento, concepción, gestación, parto, lactancia y destete, así como el desarrollo y crecimiento de la progenie. El estudio también puede mostrar los efectos de la sustancia de ensayo en la morbilidad y mortalidad neonatales, proporcionar datos preliminares sobre la toxicidad para el desarrollo prenatal y postnatal y servir de orientación para ensayos posteriores. Además de estudiar el desarrollo y crecimiento de la generación F1, el ensayo tiene por objeto evaluar la integridad y el funcionamiento del aparato reproductor del macho y la hembra, así como el desarrollo y crecimiento de la generación F2. Puede obtenerse mayor información sobre la toxicidad para el desarrollo y las deficiencias funcionales completando el presente protocolo mediante estudios descritos en los ensayos de toxicidad para el desarrollo y/o neurotoxicidad para el desarrollo, según proceda, o estudiando dichos aspectos de forma independiente empleando métodos de ensayo apropiados.

1.2 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra la sustancia de ensayo en dosis escalonadas a varios lotes de machos y hembras. En el caso de los machos de la generación P (generación parental), se administra a lo largo del crecimiento y al menos durante un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 en la rata) para poder observar los posibles efectos adversos sobre la espermatogénesis. Los efectos en el esperma se valoran mediante diversos parámetros (morfología y motilidad de los espermatozoides, etc.), preparaciones tisulares y análisis histopatológico exhaustivo. Si se dispone de datos relativos a la espermatogénesis obtenidos en estudios previos con dosis repetidas de duración suficiente (por ejemplo, 90 días), no será preciso incluir los machos de la generación P en la evaluación. No obstante, se recomienda conservar muestras o grabaciones digitales del esperma de esta generación para su posterior evaluación. La sustancia de ensayo se administra a las hembras de la generación P durante el crecimiento y a lo largo de varios ciclos estruales completos para detectar todos los efectos adversos en el ciclo estrual. Asimismo, se administra a los animales de la generación P durante el período de apareamiento y las gravideces resultantes hasta el destete de su descendencia (generación F1). Tras el destete, se sigue administrando la sustancia a la generación F1 durante todo el crecimiento, el período de apareamiento y el nacimiento de la generación F2, hasta el destete de esta última.

Se someten todos los animales a observación clínica y examen patológico para detectar signos de toxicidad. El examen tendrá por objeto principal evaluar los efectos sobre la integridad y el funcionamiento del aparato reproductor de las hembras y los machos y sobre el desarrollo y crecimiento de la descendencia.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.3.1 Selección de la especie animal

La especie idónea para el ensayo es la rata. Si se emplea otra distinta, debe justificarse y procederse a las adaptaciones pertinentes. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Al principio del experimento, la variación ponderal de los animales empleados ha de ser mínima y no superar el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo.

1.3.2 Condiciones de alojamiento y alimentación

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ})$ y con una humedad relativa mínima del 30% y preferiblemente inferior al 70% , salvo durante la limpieza del local, si bien lo ideal es que esté comprendida entre el 50% y el 60% . Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta.

Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobado el apareamiento, las hembras que se hayan apareado se colocarán en jaulas individuales preparadas para el parto y la maternidad. También pueden enjaularse en grupos reducidos y separarse uno o dos días antes del parto. Cuando se acerque la fecha de éste, se les proporcionará material adecuado y determinado de nidificación.

1.3.3 Preparación de los animales

Deben emplearse animales jóvenes sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Es preciso conocer las relaciones de consanguinidad entre los animales para evitar el apareamiento entre hermanos. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control (se recomienda agruparlos por niveles ponderales). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto. Los animales de la generación P deben

numerarse antes de iniciar el tratamiento y los de la generación F1 que se seleccionen para el apareamiento, en el momento del destete. Debe registrarse la camada de origen de todos los animales de la generación F1 seleccionados. Además de ello, se recomienda identificar cada cría tan pronto como sea posible tras el nacimiento si se tiene intención de pesarlás por separado o someterlas a ensayos funcionales.

Los animales de la generación P han de tener entre 5 y 9 semanas de edad cuando se inicie el tratamiento. Los lotes de ensayo han de ser tan homogéneos como sea posible por lo que respecta al peso y edad de los animales.

1.4 PROCEDIMIENTO

1.4.1 Número y sexo de los animales

Cada lote de ensayo y de control debe estar integrado por una cantidad de animales que permita disponer de un mínimo de 20 hembras grávidas a término o casi. En el caso de las sustancias que provocan efectos indeseables (por ejemplo, esterilidad o toxicidad excesiva a la dosis más alta), puede resultar imposible. Se trata de obtener un número suficiente de hembras grávidas para realizar una evaluación significativa de los efectos de la sustancia de ensayo sobre la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno, así como sobre la lactancia, desarrollo y crecimiento de la descendencia F1 desde la concepción hasta la madurez, y sobre el desarrollo de la generación F2 hasta el destete. Por consiguiente, el hecho de no conseguir el número deseado de hembras grávidas (es decir, 20) no invalida necesariamente el estudio y debe valorarse caso por caso.

1.4.2 Preparación de las dosis

Se recomienda administrar la sustancia de ensayo por vía oral (con el alimento o el agua de bebida o por sonda), salvo que se considere más apropiado emplear otra vía (cutánea o inhalatoria).

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

1.4.3 Posología

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. A menos que las características fisicoquímicas o las propiedades biológicas de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. En caso de que se produzca un índice de mortalidad inesperado, si el correspondiente a la generación P es inferior al 10 % aproximadamente, el estudio sigue siendo aceptable. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las reacciones en función de la dosis y la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si la sustancia de ensayo se añade a los alimentos, el intervalo entre las dosis no debe superar un factor de 3. Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad, en particular los resultados de los estudios de dosis repetidas, y la información complementaria relativa al metabolismo y la cinética de la sustancia de ensayo o productos afines. Dicha información servirá asimismo para justificar la pertinencia de la gama de dosis.

Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia de ensayo, pero sí el vehículo en caso de que éste se utilice para la sustancia. Salvo por lo que respecta a la administración de sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. En su caso, los lotes de control han de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta o asimilación, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo. En lugar de ello, pueden emplearse los resultados de estudios de control destinados a evaluar los efectos de la disminución del consumo de alimentos sobre los parámetros de la reproducción.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales.

1.4.4 Ensayo límite

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente al menos a 1000 mg/kg peso corporal/día, administrada por vía oral, o un porcentaje equivalente si se incorpora en los alimentos o el agua, y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable en los padres ni en la progenie y si, a la luz de los datos disponibles (por ejemplo, sobre sustancias con características estructurales y/o metabólicas similares), no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis oral superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo (solubilidad, etc.) las que determinan y limitan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse.

1.4.5 Administración de las dosis

La sustancia de ensayo se administra diariamente a los animales, los siete días de la semana y preferiblemente por vía oral (con los alimentos o el agua de bebida o por sonda). En caso de emplearse otra vía, debe justificarse y efectuarse las modificaciones oportunas. Se utilizará la misma forma de administración para todos los animales durante el período experimental apropiado. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse con

una sonda gástrica. El volumen máximo de líquido administrado de una sola vez no debe superar 1 ml/100g de peso corporal (0,4 ml/100g de peso corporal en caso de que se emplee aceite de maíz como vehículo), salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis. En los ensayos en que se emplee sonda, en principio las crías reciben la sustancia de ensayo indirectamente a través de la leche materna hasta que se inicia la administración directa en el destete. En los estudios en que la sustancia de ensayo se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, las crías también la reciben directamente cuando empiezan a alimentarse solas en la última semana de lactancia.

Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante respecto al peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal. El ajuste deberá tener presente la difusión placentaria.

1.4.6 Programa experimental

La administración diaria de la sustancia de ensayo a los machos y las hembras de la generación P se inicia cuando tienen entre 5 y 9 semanas de edad y a los de la generación F1, en el destete. Debe tenerse presente que cuando la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, las crías de la generación F1 ya ha estado expuestas directamente durante la lactancia. Se sigue administrando la sustancia a los animales de ambos sexos de las generaciones P y F1 al menos durante 10 semanas antes del período de apareamiento y durante las dos semanas de dicho período. Los machos que no vayan a emplearse para evaluar los efectos sobre la reproducción se sacrifican por métodos compasivos y se estudian. La sustancia de ensayo sigue administrándose a las hembras de la generación P durante la gestación y hasta el destete de su progenie F1. Puede ser oportuno modificar el programa de administración de las dosis a la luz de la información disponible sobre la sustancia de ensayo, en particular sobre la toxicidad, la inducción metabólica o la bioacumulación. Por lo general, la dosis que se administra a cada animal se calcula con arreglo a la última determinación del peso corporal, si bien conviene ser prudente al adaptar la dosis en el último período de la gestación.

Los machos y hembras de las generaciones P y F1 siguen recibiendo sustancia de ensayo hasta que sean sacrificados por métodos compasivos, cuando ya no sean necesarios para evaluar los efectos sobre la reproducción. Los descendientes F1 que no se seleccionen para el apareamiento y todos los descendientes F2 se sacrificarán por métodos compasivos después del destete.

1.4.7 Apareamiento

1.4.7.1 *Apareamiento de la generación parental (P)*

Para cada apareamiento, se juntan una hembra y un macho tratados con la misma dosis (apareamiento 1:1) hasta que se produzca la cópula o durante dos semanas. Las hembras se observan todos los días para detectar la presencia de esperma o tapón vaginal. El día 0 de la gestación es el día en que se observa un tapón vaginal o la presencia de esperma. Si no se produce apareamiento, puede plantearse otro intento con hembras y machos de comprobada capacidad reproductora del mismo lote. Las parejas deben quedar claramente identificadas en los resultados. Debe evitarse el apareamiento entre animales hermanos.

1.4.7.2 *Apareamiento de la generación F1*

Se seleccionan al menos un macho y una hembra de cada camada de la generación F1 en el momento del destete con objeto de aparearlos con otras crías tratadas con la misma dosis, pero pertenecientes a otra camada, para obtener la generación F2. La selección de las crías de la misma camada debe hacerse al azar si no presentan diferencias significativas de peso corporal ni de aspecto. Si se observan diferencias, se seleccionan los mejores ejemplares de cada camada. Desde el punto de vista pragmático, resulta más fácil seleccionarlos en función del peso corporal, si bien puede estar más indicado basarse en el aspecto. Los descendientes F1 no deben aparearse antes de alcanzar la plena madurez sexual.

Las parejas sin descendencia deben estudiarse con objeto de determinar la causa aparente de infertilidad. Para ello, puede dárseles otras oportunidades de aparearse con machos o hembras de comprobada capacidad reproductora, efectuarse el examen microscópico de los órganos reproductores o estudiarse los ciclos estruales o la espermatogénesis.

1.4.7.3 *Segundo apareamiento*

En algunos casos, en particular cuando las dimensiones de la camada se ven modificadas por el tratamiento o cuando se observa un efecto equívoco en el primer apareamiento, se recomienda volver a aparear los adultos P o F1 para obtener una segunda camada. Conviene volver a aparear las hembras o machos que no hayan engendrado con un reproductor o reproductora de capacidad comprobada. Si se considera necesaria una segunda camada de alguna de las generaciones, los animales deben aparearse más o menos una semana después del destete de la primera camada.

1.4.7.4 *Dimensión de la camada*

Se deja que los animales paran y crien con normalidad a su progenie hasta el destete. La normalización de la dimensión de las camadas es facultativa. Si se lleva a cabo, debe describirse detalladamente el método empleado.

1.5 OBSERVACIONES**1.5.1 Observaciones clínicas**

Debe hacerse una observación clínica general una vez al día y, en caso de administración por sonda, teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registran los cambios en el comportamiento, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad. Además de ello, al menos una vez por semana se examinan todos los animales de forma más exhaustiva; puede hacerse coincidiendo con los días en que se pesen los animales. Se examinan todos los animales dos veces al día y una vez al día durante los fines de semana, según proceda, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

1.5.2 Peso corporal y consumo de alimentos y agua de los animales parentales

Los animales de las generaciones P y F1 deben pesarse el día de la primera administración y a continuación al menos una vez por semana. Las madres (P y F1) se pesan, al menos, los días 0, 7, 14 y 20 ó 21 de la gestación; durante la lactancia, los mismos días en que se pesen las crías y, por último, el día del sacrificio. Los resultados se registran para cada animal adulto por separado. Durante el período previo al apareamiento y durante la gestación, se mide al menos una vez por semana el consumo de alimentos. Si la sustancia de ensayo se administra con el agua, el consumo de ésta se mide al menos una vez por semana.

1.5.3 Ciclo estrual

Se estudia la duración y normalidad del ciclo estrual en las hembras P y F1 mediante frotis vaginales antes del apareamiento y, con carácter facultativo, durante éste, hasta que se compruebe que ha habido apareamiento. La toma de células vaginales o cervicales ha de hacerse con cuidado para no dañar la mucosa y evitar una pseudogestación (1).

1.5.4 Parámetros de evaluación del esperma

Se registra el peso de los testículos y epidídimos de todos los machos P y F1 tras el sacrificio y se conserva un ejemplar de cada órgano para el examen histopatológico (véanse los apartados 1.5.7 y 1.5.8.1). Se conservan los testículos y epidídimos restantes de un sublote integrado al menos por 10 machos de cada grupo de machos P y F1, para contar las espermátides resistentes a la homogeneización y los espermatozoos almacenados en la cola del epidídimo, respectivamente. En ese mismo sublote de machos, se recoge el contenido de la cola del epidídimo o el conducto deferente para evaluar la motilidad y morfología de los espermatozoides. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento o los resultados de otros estudios ponen de manifiesto que la sustancia de ensayo puede afectar a la espermatogénesis, debe efectuarse la evaluación del esperma en todos los machos de cada lote tratado; en caso contrario, el recuento puede limitarse a los machos P y F1 del lote de control y los lotes tratados con la dosis superior.

Debe contarse la totalidad de las espermátides testiculares resistentes a la homogeneización y los espermatozoos de la cola del epidídimo (2)(3). La reserva caudal de espermatozoos puede deducirse de la concentración y el volumen presentes en la suspensión utilizada para completar las evaluaciones cualitativas y de la cantidad de espermatozoos recuperados tras triturar u homogeneizar el tejido caudal restante. El recuento debe efectuarse inmediatamente después del sacrificio, en el sublote de machos seleccionados en los grupos tratados con las distintas dosis, salvo que se realicen grabaciones digitales o de vídeo, o se congelen las muestras para su posterior análisis. En estos casos pueden analizarse en primer lugar el lote de control y el tratado con la dosis más alta y, si no se observan efectos relacionados con el tratamiento (por ejemplo, en la cantidad, motilidad o morfología de los espermatozoides), no es preciso analizar los demás lotes. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento en el lote tratado con la dosis más alta, deberán someterse a análisis los lotes tratados con dosis inferiores.

Debe evaluarse o grabarse en soporte de vídeo inmediatamente después del sacrificio la motilidad de los espermatozoides en el epidídimo o el conducto deferente. Se toma una muestra de esperma evitando al máximo dañar los tejidos y se diluye para estudiar la motilidad mediante métodos aceptables (4). El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles se determina de forma objetiva o subjetiva. Si se realiza un análisis de la motilidad asistido por ordenador (5)(6)(7)(8)(9)(10), la motilidad progresiva se evalúa con arreglo a umbrales de velocidad media de trayectoria y movimiento en línea recta o índice lineal, definidos por el usuario. Si las muestras se graban en vídeo (11) o se graban las imágenes de otra manera en el momento de la autopsia, el análisis posterior puede limitarse a los machos P y F1 del lote de control y del tratado con la dosis más alta, salvo que se hayan observado efectos relacionados con el tratamiento, en cuyo caso habrá que evaluar asimismo los lotes tratados con dosis inferiores. Si no se dispone de imágenes de vídeo ni digitales, se analizarán en la autopsia todas las muestras de todos los lotes tratados.

Se llevará a cabo el análisis morfológico de una muestra de esperma del epidídimo o el conducto deferente. Los espermatozoides (al menos 200 por muestra) se fijan y analizan en preparaciones húmedas (12), y se clasifican entre normales o anómalos. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides incluyen las fusiones, las cabezas aisladas y las cabezas o las colas deformadas. La evaluación ha de efectuarse en el sublote de machos seleccionados de los grupos tratados con las distintas dosis, inmediatamente después del sacrificio o posteriormente a partir de grabaciones de vídeo o digitales. Una vez fijados, los frotis también pueden analizarse en un momento posterior. En estos casos pueden analizarse en primer lugar el lote de control y el tratado con la dosis más alta y, si no se observan efectos relacionados con el tratamiento (sobre la morfología de los espermatozoides, por ejemplo), no es preciso analizar los demás lotes. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento en el lote tratado con la dosis más alta, deberán someterse a análisis los lotes tratados con dosis inferiores.

Si alguno de los parámetros mencionados de evaluación del esperma ya ha sido analizado en un estudio de toxicidad sistémica de 90 días al menos, no es necesario repetir el análisis en el estudio de la toxicidad en dos generaciones. Se recomienda, no obstante, conservar muestras o grabaciones digitales del esperma de la generación P para poder repetir la evaluación, si fuera necesario.

1.5.5 Descendencia

Se examinan todas las camadas lo antes posible después del parto (día 0 de la lactancia) para determinar el número y sexo de las crías, la mortinatalidad, el número de nacidos vivos y la presencia de anomalías macroscópicas. Es preferible examinar las crías halladas muertas el día 0, si no están maceradas, para detectar posibles anomalías y determinar la causa de la muerte y, a continuación, conservarlas. Las crías vivas se cuentan y pesan por separado al nacer (día 0 de la lactancia) o el día 1 y luego de forma periódica (por ejemplo, los días 4, 7, 14 y 21 de la lactancia). Se registran las anomalías físicas y las alteraciones del comportamiento de las madres y las crías.

Se registra el desarrollo físico de la progenie, anotando la ganancia de peso corporal. Otros parámetros físicos (apertura de las orejas y los ojos, erupción de dientes, crecimiento del pelo, etc.) pueden proporcionar información adicional, si bien es preferible emplear esos datos para evaluar la madurez sexual (edad y peso corporal en el momento de la apertura de la vagina o la separación balanoprepucial, etc.) (13). Si no forma parte de otros estudios, se recomienda efectuar la valoración funcional (actividad motriz, funciones sensoriales, ontogenia de los reflejos, por ejemplo) de la progenie F1 antes y/o después del destete, sobre todo por lo que respecta a la maduración sexual. En los descendientes F1 recién destetados y seleccionados para el apareamiento debe determinarse la edad a la que se produzca la apertura de la vagina y la separación balanoprepucial. Si se observa una alteración de la proporción de machos y hembras o de la edad de maduración sexual en la generación F1, debe medirse la distancia anogenital en las crías F2 el día del nacimiento.

Las observaciones funcionales no son obligatorias en los lotes que presenten signos evidentes de toxicidad (disminución significativa de la ganancia de peso, etc.). Si se efectúan exploraciones funcionales, se harán en las crías que no se hayan seleccionado para el apareamiento.

1.5.6 Autopsia macroscópica

Justo después del sacrificio o la muerte ocurrida durante el estudio, se someten a examen macroscópico para detectar toda anomalía estructural o cambio patológico todos los animales parentales (P y F1), todas las crías que presenten anomalías externas o signos clínicos y una cría seleccionada al azar de cada sexo y camada de las generaciones F1 y F2. Se prestará especial atención a los órganos reproductores. Deben examinarse y conservarse las crías moribundas que se sacrifiquen por métodos compasivos y las crías muertas, si no están maceradas, para detectar posibles anomalías y establecer la causa de la muerte.

Debe procederse al examen de los úteros de todas las hembras primíparas, sin comprometer la evaluación histopatológica, para detectar la presencia de puntos de implantación y contarlos.

1.5.7 Pesaje de los órganos

Tras el sacrificio, se determina el peso corporal de todos los animales parentales P y F1, así como el de los órganos siguientes (los órganos pares se pesarán por separado):

- Útero y ovarios;
- Testículos y epidídimos (enteros y colas);
- Próstata;
- Vesículas seminales con glándulas coagulantes y sus líquidos, y próstata (conjunto);
- Cerebro, hígado, riñones, bazo, hipófisis, glándula tiroides, glándulas suprarrenales y órganos diana conocidos.

Se determina el peso corporal de las crías F1 y F2 sacrificadas que se hayan seleccionado para la autopsia, así como el peso del cerebro, bazo y timo de una cría seleccionada al azar de cada sexo y camada (véase el apartado 1.5.6).

Si es posible, los resultados de la autopsia macroscópica y del pesaje de órganos se interpretan a la luz de las observaciones realizadas en otros estudios con dosis repetidas.

1.5.8 Histopatología

1.5.8.1 Animales parentales

Los siguientes órganos y tejidos de los animales parentales (P y F1), o muestras representativas de éstos, se fijan y conservan en un medio apropiado con vistas al examen histopatológico.

- Vagina, útero con cuello, y ovarios (conservados en un fijador apropiado);
- Un testículo (conservado en líquido de Bouin o un fijador comparable), un epidídimo, las vesículas seminales, la próstata y una glándula coagulante;
- Órgano u órganos diana previamente identificados de todos los animales P y F1 seleccionados para el apareamiento.

Debe realizarse un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos antes mencionados de todos los animales P y F1 del lote de control y el lote tratado con la dosis más alta, que se hayan seleccionado para el apareamiento. El examen de los ovarios de las hembras P es facultativo. Deben examinarse, asimismo, los órganos que presenten alteraciones relacionadas con el tratamiento en los lotes tratados con las dosis inferior y media, con objeto de facilitar la determinación de la NOAEL. Además de ello, se someterán a evaluación histopatológica los órganos reproductores de los animales tratados con las dosis inferior y media, en los que se sospeche una disminución de la fertilidad, por ejemplo, los que no se hayan apareado, no hayan concebido, no hayan engendrado o no hayan tenido una progenie sana, o en los que se hayan observado alteraciones del ciclo estrual o de la cantidad, motilidad o morfología de los espermatozoides. Se examinarán todas las lesiones macroscópicas como atrofias o tumores.

Debe efectuarse un examen histopatológico pormenorizado de los testículos (por ejemplo, con líquido de Bouin, inclusión en parafina y cortes transversales de 4-5µm de espesor) para poner de manifiesto los efectos relacionados con el tratamiento como la retención de espermátides, la ausencia de algunas capas o tipos de células germinales, la presencia de células gigantes plurinucleadas o el desprendimiento de células espermatogénicas a la luz de los túbulos seminíferos (14). El examen del epidídimo intacto ha de abarcar la cabeza, el cuerpo y la cola, y puede efectuarse en una sección longitudinal. Se analiza el epidídimo para ver si hay infiltración leucocitaria, cambios en la frecuencia de los tipos celulares, células aberrantes y fagocitosis de espermatozoides. El análisis de los órganos reproductores de los machos puede realizarse mediante coloración con PAS o hematoxilina.

Tras la lactancia, el ovario debe contener folículos primordiales, folículos en crecimiento y grandes cuerpos amarillos de la lactancia. El examen histopatológico debe poner de manifiesto la depleción cualitativa de la población de folículos primordiales. Debe efectuarse una evaluación cuantitativa de los folículos primordiales de las hembras F1; el número de animales, la elección de la sección ovárica y el tamaño de las muestras de secciones han de ser válidas desde el punto de vista estadístico para el método de evaluación empleado. En el examen debe hacerse el recuento de los folículos primordiales, que pueden estar combinados con pequeños folículos en crecimiento, para efectuar la comparación de los ovarios de las hembras de los lotes tratados y del de control (15)(16)(17)(18)(19).

1.5.8.2 *Crías destetadas*

Se fijan y conservan en un medio adecuado para el posterior examen histopatológico los tejidos que presenten anomalías macroscópicas y los órganos diana de todas las crías que presenten anomalías externas o signos clínicos, así como de la cría seleccionada al azar de cada sexo y camada de las generaciones F1 y F2, que no haya sido seleccionada para el apareamiento. La descripción histopatológica completa de los tejidos conservados se centrará sobre todo en los órganos reproductores.

2 RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal por separado y resumirse en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo y cada generación, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras grávidas, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de observaciones de los animales parentales y las crías, los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos debe efectuarse en la fase de diseño del estudio y justificarse. Los modelos estadísticos aplicables a las relaciones dosis-respuesta pueden resultar útiles para analizar los resultados. El informe debe recoger información suficiente sobre el método y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluar y reconstruir el análisis.

2.2 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones deben evaluarse respecto a los efectos observados, en particular en la autopsia y los exámenes microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación, o la ausencia de relación, entre la dosis de sustancia de ensayo y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, alteración de la fertilidad, anomalías clínicas, alteración de la capacidad de reproducción y del rendimiento de la camada, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico. Los resultados del estudio han de interpretarse teniendo presentes las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de ensayo y, en su caso, los datos toxicocinéticos.

Un ensayo de toxicidad para la reproducción correctamente realizado debe proporcionar una estimación satisfactoria de la dosis sin efecto y poner de manifiesto los efectos adversos sobre la reproducción, el parto, la lactancia y el desarrollo postnatal, en particular el crecimiento y la maduración sexual.

2.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones proporciona información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia durante todas las fases del ciclo de reproducción y, en particular, sobre los parámetros de la reproducción y el desarrollo, crecimiento, maduración y supervivencia de la descendencia. Los resultados del estudio han de interpretarse a la luz de los de los estudios subcrónicos, de desarrollo prenatal, toxicocinéticos y de otro tipo. Los resultados del presente estudio pueden servir para valorar la necesidad de realizar más ensayos con una sustancia química. La validez de la extrapolación de los resultados del estudio al hombre es limitada. Resultan más útiles para determinar las dosis sin efecto y el grado de exposición humana aceptable (20)(21)(22)(23).

3 **INFORME****INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

- naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas;
- identificación;
- pureza.

Vehículo (si procede):

- justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

- especie y cepa empleada;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, material de nidificación, etc.;
- peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

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

Resultados:

- consumo de alimentos y agua, si se ha medido, rendimiento alimentario (ganancia de peso corporal por gramo de alimentos consumidos) y sustancia de ensayo consumida por los animales P y F1, salvo durante el período de cohabitación y, al menos, el último tercio de la lactancia;
- datos relativos a la absorción (si procede);
- peso corporal de los animales P y F1 seleccionados para el apareamiento;
- datos sobre las camadas y peso de las crías;
- peso corporal en el momento del sacrificio y peso absoluto y relativo de los órganos de los animales parentales;
- naturaleza, gravedad y duración de los signos clínicos (reversibles o no);
- fecha de las muertes sobrevenidas durante el ensayo y animales que han sobrevivido hasta el sacrificio;
- reacción tóxica por sexo y dosis, incluidos los índices de apareamiento, fecundidad, gestación, natalidad, viabilidad y lactancia; el informe debe mencionar las cifras empleadas para calcular los índices;
- efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie, el crecimiento postnatal, etc.;
- hallazgos de la autopsia;
- descripción detallada de todos los hallazgos histopatológicos;
- número de hembras P y F1 con ciclos normales y duración del ciclo;
- número total de espermatozoides en la cola del epidídimo, porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, porcentaje de espermatozoides de morfología normal y porcentaje de espermatozoides por anomalía detectada;
- tiempo transcurrido hasta el apareamiento, expresado en días;
- duración de la gestación;
- número de implantaciones, cuerpos amarillos, dimensión de la camada;
- número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias;
- número de crías con anomalías macroscópicas y número de crías retrasadas, si se ha determinado;
- parámetros físicos evaluados en las crías y otros datos relativos al desarrollo postnatal; los parámetros físicos evaluados han de justificarse;
- observaciones funcionales realizadas en las crías y los adultos, según proceda;
- tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones, incluida la NOAEL en la madre y la progenie.

4 **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, En: *Reproduction in Mammals*: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Austin and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237-244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (9) Slott, V.L. y Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. En: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401-415.
- (11) Working, P.K. y M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. y R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. En: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
- (17) Manson, J.M. y Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. En: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. En: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. En: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. y E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. En: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). En: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

B.43. ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD EN ROEDORES

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 424 (1997).

Este método de ensayo tiene por objeto obtener la información necesaria para confirmar o caracterizar de manera más precisa la posible neurotoxicidad de sustancias químicas en animales adultos. Puede combinarse con los actuales métodos de ensayo de los estudios de toxicidad por administración continuada o bien realizarse como estudio independiente. Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre estrategias y métodos de ensayo de neurotoxicidad (1) (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods), que puede servir de ayuda para la concepción de estudios basados en este método de ensayo. Esta consulta es especialmente importante cuando se recomienden modificaciones de las observaciones y procedimientos de ensayo para el uso habitual del presente método. El documento orientativo se ha preparado a fin de facilitar la selección de otros procedimientos de ensayo que puedan emplearse en determinadas circunstancias.

En el presente método no se trata la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo.

1.1 INTRODUCCIÓN

En la evaluación de las características tóxicas de las sustancias químicas, es importante considerar el potencial de efectos neurotóxicos. El método de ensayo de toxicidad sistémica por administración continuada incluye ya observaciones para detectar la posible neurotoxicidad. El presente método de ensayo puede utilizarse para preparar un estudio destinado a obtener más información sobre los efectos neurotóxicos observados en los estudios de toxicidad sistémica por administración continuada o para confirmar tales efectos. Sin embargo, según la valoración que se haga de la posible neurotoxicidad de ciertas clases de sustancia química puede considerarse más conveniente evaluarlas mediante este método sin indicación previa de la posible neurotoxicidad a partir de estudios de toxicidad sistémica por administración continuada. Entre los aspectos que deben tenerse en cuenta para ello pueden citarse los siguientes:

- observación de signos neurológicos o lesiones neuropatológicas en estudios de toxicidad distintos de los estudios de toxicidad sistémica por administración continuada, o
- relación estructural u otro tipo de información que los relacione con neurotóxicos conocidos.

Además puede haber otros casos en los que sea adecuado utilizar este método de ensayo, para más información véase (1).

El presente método se ha concebido de manera que pueda ajustarse a distintas necesidades concretas a la hora de confirmar la neurotoxicidad histopatológica y comportamental de una sustancia, y de aportar una caracterización y cuantificación de las respuestas neurotóxicas.

Anteriormente, la neurotoxicidad se equiparaba a la neuropatía que implicaba lesiones neuropatológicas o disfunciones neurológicas, como convulsiones, parálisis o temblores. Aunque la neuropatía es una manifestación importante de la neurotoxicidad, actualmente se sabe que hay muchos otros signos que indican toxicidad en el sistema nervioso (por ejemplo, pérdida de coordinación motora, deficiencias sensoriales y disfunciones del aprendizaje y la memoria) y que pueden no aparecer en estudios de neuropatía o en otros tipos de estudios.

El presente método de ensayo de neurotoxicidad está pensado para detectar efectos neuropatológicos y neurocomportamentales en roedores adultos. Aunque los efectos en el comportamiento, incluso en ausencia de cambios morfológicos, pueden dar cuenta de un impacto nocivo en el organismo, no todas las alteraciones del comportamiento están relacionadas con el sistema nervioso. Por lo tanto, cualquier cambio observado tiene que evaluarse junto con datos correlativos de tipo bioquímico, hematológico e histopatológico, y con datos sobre otros tipos de toxicidad sistémica. Las pruebas prescritas en este método para obtener la caracterización y cuantificación de las respuestas neurotóxicas incluyen procedimientos comportamentales e histopatológica que pueden ir apoyados de manera complementaria por investigaciones bioquímicas y/o electrofisiológicas (1)(2)(3)(4).

Los neurotóxicos pueden actuar sobre un número de dianas dentro del sistema nervioso y mediante una gran variedad de mecanismos. Dado que no hay ningún conjunto de ensayos que, por sí solo, sea capaz de evaluar perfectamente el potencial neurotóxico de todas las sustancias, puede ser necesario utilizar otros ensayos *in vivo* o *in vitro* aplicables concretamente al tipo de neurotoxicidad observada o prevista.

Este método de ensayo puede aplicarse también junto con las orientaciones establecidas en el documento de la OCDE denominado "OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods" (1) a fin de preparar estudios destinados a caracterizar de manera más precisa la cuantificación dosis-respuesta o a aumentar la sensibilidad de ésta, de manera que pueda estimarse más exactamente un nivel sin efectos adversos observados o comprobar peligros sospechados o conocidos de la sustancia. Por ejemplo, pueden prepararse estudios para determinar y evaluar los mecanismos neurotóxicos o para complementar los datos ya disponibles a partir de los procedimientos básicos de observación neuropatológica y neurocomportamental. No es necesario que estos estudios generen de nuevo datos que se obtendrían también a partir de los procedimientos estándar recomendados en el presente método, si estos datos ya son conocidos y no se consideran necesarios para la interpretación de los resultados del estudio.

Este estudio de neurotoxicidad, cuando se realiza solo o en combinación con otros, aporta información que puede:

- determinar si el sistema nervioso está afectado de manera permanente o reversible por la sustancia ensayada;
- contribuir a la caracterización de las alteraciones del sistema nervioso relacionadas con la exposición a la sustancia y a la comprensión de los mecanismos que intervienen;
- determinar las relaciones entre dosis y tiempo de respuesta a fin de estimar un nivel sin efectos adversos observados (que pueda utilizarse con objeto de establecer criterios de seguridad para la sustancia).

En este método de ensayo se administra la sustancia estudiada por vía oral. Otras vías de administración (por ejemplo, por vía dérmica o por inhalación) pueden resultar más adecuadas y requerir modificaciones de los procedimientos recomendados. La elección de la vía de administración depende del perfil de exposición humana y de la información cinética y toxicológica disponible.

1.2 DEFINICIONES

Efecto adverso: toda alteración respecto a una situación de referencia, relacionada con el tratamiento, que disminuya la capacidad del organismo para sobrevivir, reproducirse o adaptarse al entorno.

Dosis: cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

Posología: término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

Neurotoxicidad: alteración adversa de la estructura o función del sistema nervioso debida a la exposición a un agente físico, biológico o químico.

Neurotóxico: cualquier agente físico, biológico o químico que pueda provocar neurotoxicidad.

NOAEL: sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra por vía oral una serie de dosis de la sustancia a varios grupos de roedores de laboratorio. Normalmente se requiere una administración continuada y el período de administración puede ser 28 días, 90 días (toxicidad subcrónica) o 1 año o más (toxicidad crónica). Los procedimientos establecidos en este método de ensayo pueden aplicarse también a un estudio de neurotoxicidad aguda. Los animales se someten a ensayo para detectar anomalías neurológicas o del comportamiento o para caracterizarlas. Durante cada período de observación se evalúa una gama de comportamientos que podría estar afectada por neurotóxicos. Al final del ensayo, se hace una perfusión *in situ* a un subgrupo de animales de cada sexo y de cada grupo, y se preparan y examinan secciones de los nervios periféricos y de la médula espinal y el cerebro.

Cuando se trate de un estudio único independiente destinado a detectar neurotoxicidad o a caracterizar los efectos neurotóxicos, los animales de cada grupo no empleados para perfusión y posterior histopatología (véase el cuadro 1) pueden utilizarse para otros procedimientos concretos de tipo electrofisiológico, neuroquímico, neuropatológico o neurocomportamental que puedan complementar los datos obtenidos a partir de los exámenes estándar prescritos en el presente método (1). Estos procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando las observaciones empíricas o los efectos previstos indiquen un tipo determinado o una diana de neurotoxicidad química. Otra posibilidad es utilizar los animales restantes para evaluaciones como las prescritas en los métodos de ensayo para estudios de toxicidad por administración continuada en roedores.

Cuando los procedimientos del presente método de ensayo se combinen con los de otros métodos, se necesita un número suficiente de animales para que puedan cumplirse todos los requisitos de las observaciones de ambos estudios.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 Selección de la especie animal

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Las hembras deben ser nulas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete, preferiblemente, antes de que los animales tengan seis semanas de edad y, en cualquier caso, antes de que tengan nueve semanas. No obstante, cuando este estudio se combine con otros, podrían tener que ajustarse estos requisitos de edad. Al principio del estudio, la diferencia de peso entre los animales empleados no debe superar el $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Cuando se realice un estudio de la toxicidad oral por administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

1.4.2 Alojamiento y alimentación

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Debe mantenerse al mínimo el ruido fuerte intermitente. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo.

1.4.3 Preparación de los animales

Se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en los lotes testigo y tratado. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Los animales se identifican individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos cinco días antes del inicio del ensayo, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

1.4.4 **Vía de administración y preparación de las dosis**

En este método de ensayo se administra la sustancia estudiada por vía oral. La administración de la sustancia por vía oral puede hacerse mediante una sonda, la dieta, el agua o cápsulas. Pueden usarse otras vías de administración (por ejemplo: cutánea o inhalación) pero en este caso pueden tener que modificarse los procedimientos recomendados. La elección de la vía de administración depende del perfil de exposición humana y de la información cinética y toxicológica disponible. Deberá justificarse adecuadamente la elección de la vía de administración, así como las consiguientes modificaciones de los procedimientos del método de ensayo.

En caso necesario, la sustancia estudiada se disolverá o suspenderá en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible solución o suspensión en otros vehículos. Las características tóxicas del vehículo deben ser conocidas. Además, deben valorarse las siguientes características del vehículo: efectos en la absorción, la distribución, el metabolismo o la retención de la sustancia estudiada que puedan alterar sus características tóxicas; y efectos en el consumo de alimentos y agua o en el estado nutricional de los animales.

1.5 PROCEDIMIENTOS

1.5.1 **Número y sexo de los animales**

Cuando se trate de un estudio único independiente, se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) en cada grupo tratado y de control para la evaluación de las observaciones clínicas y funcionales, que deben ser detalladas. Como mínimo 5 machos y 5 hembras, seleccionados entre estos 10 machos y 10 hembras, deben ser perfundidos in situ y utilizados para hacer una histopatología detallada al final del estudio. En los casos en que sólo se observe un número limitado de animales en un grupo determinado para detectar efectos neurotóxicos, se considerará la inclusión de estos animales entre los seleccionados para perfusión. Cuando el estudio se lleve a cabo en combinación con un estudio de toxicidad por administración continuada, deberá usarse un número adecuado de animales para que puedan alcanzarse los objetivos de ambos estudios. En el cuadro 1 se da el número mínimo de animales por grupo para varias combinaciones de estudios. Si van a sacrificarse animales durante el experimento o están previstos grupos para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de efectos tóxicos con posterioridad al tratamiento, o cuando se plantee la realización de observaciones complementarias, habrá de aumentarse el número de animales para asegurar que se dispone de los animales necesarios para observación e histopatología.

1.5.2 **Lote tratado y lote testigo**

Deben utilizarse, al menos, tres grupos para tratamiento y uno para control. No obstante, si, a partir de la evaluación de otros datos, no son previsibles efectos a una dosis continuada de 1 000 mg/kg de peso corporal, podrá realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio para ayudar a determinar la gama de dosis que debe emplearse. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia de ensayo, el lote testigo recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

1.5.3 **Control de fiabilidad**

El laboratorio que lleve a cabo el estudio debe presentar datos que demuestren su capacidad de realizarlo y la sensibilidad de los procedimientos que emplee. Tales datos han de acreditar su capacidad de detectar y cuantificar, en su caso, los cambios en los diferentes parámetros cuya observación se recomienda, como signos neurovegetativos, reactividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz. En la bibliografía (referencias 2 a 29) puede encontrarse información sobre sustancias que causan diferentes tipos de respuestas neurotóxicas y que pueden usarse para controles positivos. Pueden utilizarse datos de referencia anteriores si se mantienen los aspectos esenciales de los procedimientos experimentales. Se recomienda la actualización periódica de los datos de referencia anteriores. Deben obtenerse nuevos datos que demuestren que los procedimientos mantienen la sensibilidad requerida cuando el laboratorio haya modificado alguno de los aspectos esenciales del ensayo o los procedimientos.

1.5.4 **Selección de la dosis**

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la toxicidad previamente observada y los datos cinéticos y de toxicidad disponibles referentes a la sustancia de ensayo o productos afines. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos neurotóxicos o efectos tóxicos sistémicos evidentes. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar cualquier posible relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior. En principio, las dosis deben fijarse de manera que los efectos tóxicos primarios en el sistema nervioso puedan distinguirse de los relacionados con la toxicidad sistémica. Los intervalos del doble al triple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si se dispone de una estimación razonable sobre la exposición del hombre, ésta deberá también tenerse en cuenta.

1.5.5 **Ensayo límite**

Si en un estudio con una dosis de, al menos, 1 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo el procedimiento descrito, no se produce ningún efecto neurotóxico observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Según el grado previsto de exposición humana, puede ser preciso administrar una dosis oral superior en el ensayo límite. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo las que determinan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse. Para la realización de un estudio de toxicidad oral aguda, la dosis de un ensayo límite debe ser, al menos, 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Administración de las dosis**

Las dosis de sustancia se administran a los animales todos y cada uno de los días del período de 28; es necesario justificar la aplicación de una posología de sólo cinco días por semana o un período de exposición más corto. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal; no obstante, en el caso de las soluciones acuosas puede considerarse la posibilidad de administrar 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general

producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe precisarse el método escogido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en relación con el peso corporal del animal. Cuando se utilice un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar. Para estudios de toxicidad aguda, si no es posible utilizar una dosis única, podrá administrarse la sustancia en fracciones menores a lo largo de un período que no excederá de 24 horas.

1.6 OBSERVACIONES

1.6.1 Frecuencia de las observaciones y ensayos

En los estudios de administración continuada, el período de observación debe cubrir todo el período de administración. En los estudios de toxicidad aguda, debe haber un período de observación de 14 días posterior al tratamiento. En el caso de los animales de grupos satélite que se mantengan sin exposición durante el período posterior al tratamiento, las observaciones deben cubrir también este período.

Las observaciones deben hacerse con la frecuencia suficiente para que sea máxima la probabilidad de detección de cualquier anomalía neurológica o del comportamiento. Las observaciones deben hacerse preferiblemente a las mismas horas cada día prestando atención al período más agudo de los efectos previstos tras la administración. En el cuadro 2 se resume la frecuencia de las observaciones clínicas y las pruebas funcionales. Si, a partir de estudios anteriores, se dispone de datos cinéticos o de otro tipo que muestren la necesidad de utilizar tiempos diferentes para las observaciones, pruebas o períodos post-observación, se aplicará otro programa a fin de conseguir el máximo de información. Los cambios en el programa habrán de justificarse debidamente.

1.6.1.1 *Observaciones del estado general de salud y de la mortalidad/morbilidad*

Deberán observarse cuidadosamente todos los animales al menos una vez al día para comprobar su estado de salud y al menos dos veces al día para comprobar la mortalidad y la morbilidad.

1.6.1.2 *Observaciones clínicas detalladas*

Se someterán a observación clínica detallada todos los animales seleccionados con este fin (véase el cuadro 1) una vez antes de la primera exposición (para poder hacer comparaciones con un mismo sujeto) y después a diferentes intervalos según la duración del estudio (véase el cuadro 2). Deberán hacerse observaciones clínicas detalladas sobre lotes satélite de recuperación al final del período de recuperación. Las observaciones clínicas detalladas se harán fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y se registrarán cuidadosamente utilizando sistemas de puntuación que incluyan criterios o escalas de puntuación para cada medición de las observaciones. Los criterios o escalas deberán ser definidos explícitamente por el laboratorio que lleve a cabo el ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas (no relacionadas sistemáticamente con el tratamiento) y que las observaciones sean realizadas por observadores especializados ajenos al tratamiento.

Se recomienda que las observaciones se hagan de manera estructurada aplicando sistemáticamente criterios bien definidos (incluida la definición del "intervalo" normal) a cada animal en cada momento de observación. El "intervalo normal" deberá documentarse adecuadamente. Se registrarán todos los signos observados. Siempre que sea factible, se registrará también la magnitud de los signos observados. Las observaciones clínicas deben incluir, entre otras cosas, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, así como respiración por la boca, cualquier signo de orina o defecación y orina descolorida.).

También habrá de anotarse cualquier respuesta no habitual en lo que se refiere a la posición del cuerpo, el nivel de actividad (por ejemplo, aumento o disminución de la exploración del ambiente normal en el que se mueva) y la coordinación de los movimientos. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha (por ejemplo, contoneo o ataxia), postura (por ejemplo, espalda encorvada) y respuesta a la manipulación, la colocación u otros estímulos ambientales, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, convulsiones o temblores, estereotipos (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, movimientos anómalos de la cabeza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, lamido excesivo o mordiscos, automutilación, marcha hacia atrás y vocalización) o agresión.

1.6.1.3 *Pruebas funcionales*

De manera semejante a las observaciones clínicas detalladas, deben efectuarse también pruebas funcionales una vez antes de la exposición y frecuentemente a continuación en todos los animales seleccionados con este fin (véase el cuadro 1). La frecuencia de estas pruebas depende también de la duración del estudio (véase el cuadro 2). Además de los períodos de observación establecidos en el cuadro 2, se llevarán a cabo observaciones funcionales de lotes satélite de recuperación lo más cercanas que sea posible al sacrificio final. Las pruebas funcionales deben incluir la reactividad sensorial frente a estímulos de diferentes tipos [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (5)(6)(7)], y la evaluación de la fuerza de prensión (8) y de la actividad motriz (9). La actividad motriz se medirá con un dispositivo automático capaz de detectar tanto aumentos como disminuciones de actividad. Si se usa otro sistema definido, éste deberá ser cuantitativo y su sensibilidad y fiabilidad deberán demostrarse. Se probará cada dispositivo para asegurar la fiabilidad a lo largo del tiempo y la concordancia entre diferentes dispositivos. En las referencias respectivas se da más información sobre los procedimientos que pueden seguirse. Si no hay datos (por ejemplo, relaciones estructura-actividad, datos epidemiológicos, otros estudios toxicológicos ...) que indiquen los posibles efectos neurotóxicos, debe considerarse la inclusión de pruebas más especializadas de funciones sensoriales o motrices o del aprendizaje y la memoria, para estudiar estos posibles efectos más detalladamente. En (1) se da más información sobre pruebas más especializadas y su aplicación.

Excepcionalmente, puede omitirse la prueba a animales que muestren signos de toxicidad en un grado tal que interfiera de manera significativa la prueba funcional. La eliminación de animales de cualquier prueba funcional se justificará debidamente.

1.6.2 **Peso corporal y consumo de alimento y agua**

Para estudios de hasta 90 días de duración, tienen que pesarse todos los animales al menos una vez por semana y deben hacerse mediciones del consumo de alimentos (consumo de agua, cuando la sustancia estudiada se administre por este medio) al menos semanalmente. Para estudios a largo plazo, deben pesarse todos los animales al menos una vez por semana durante las primeras 13 semanas y al menos una vez cada cuatro semanas a continuación. Se medirá el consumo de alimentos (consumo de agua, cuando la sustancia estudiada se administre por este medio) al menos semanalmente durante las primeras 13 semanas y luego a intervalos de unos tres meses, a menos que el estado de salud o el peso corporal aconsejen otra cosa.

1.6.3 **Oftalmología**

Para estudios de más de 28 días de duración, debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo equivalente adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, preferiblemente, de todos los animales, y al menos del lote con la dosis más alta y del lote de control. Si se observan cambios oculares o si los signos clínicos lo exigen, deben examinarse todos los demás animales. Para estudios a largo plazo, debe efectuarse una exploración oftalmológica a las 13 semanas. Las exploraciones oftalmológicas no serán necesarias si se conocen ya estos datos a partir de otros estudios de duración parecida y a dosis semejantes.

1.6.4 **Hematología y bioquímica clínica**

Cuando el estudio de neurotoxicidad se haga en combinación con un estudio de toxicidad sistémica por administración continuada, se practicarán exámenes hematológicos y determinaciones bioquímicas clínicas según lo indicado en el respectivo método del estudio de toxicidad sistémica. La recogida de muestras debe hacerse de tal manera que se reduzcan al mínimo los posibles efectos en el neurocomportamiento.

1.6.5 **Histopatología**

Los análisis neuropatológicos tienen que estar pensados de manera que complementen y amplíen las observaciones efectuadas durante la fase *in vivo* del estudio. Se fijarán *in situ* tejidos de, al menos, 5 animales por sexo y por grupo (véase el cuadro 1 y el párrafo siguiente), utilizando técnicas de fijación y perfusión ampliamente reconocidas (véase la referencia 3 del capítulo 5 y la referencia 4 del capítulo 50). Deben registrarse todas las modificaciones macroscópicas observables. Cuando se trate de un estudio único independiente destinado a detectar neurotoxicidad o a caracterizar efectos neurotóxicos, el resto de los animales puede utilizarse o bien para otros procedimientos concretos de tipo electrofisiológico (10)(11)(16)(17), neuroquímico (10)(11)(14)(15), neuropatológico (10)(11)(12)(13) o neurocomportamental (10)(11) que puedan complementar los procedimientos y análisis descritos aquí o bien para aumentar el número de sujetos examinados para detectar histopatologías. Estos procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando las observaciones empíricas o los efectos previstos indiquen un tipo determinado o una diana de neurotoxicidad 82) (3). Otra posibilidad es utilizar el resto de los animales para la evaluaciones patológicas habituales descritas en el método sobre estudios de toxicidad por administración continuada.

Se aplicará un procedimiento general de tinción, como hematoxilina-eosina, en todas las muestras de tejido incluidas en parafina y se hará un examen microscópico. Cuando se observen o se sospechen signos de neuropatía periférica, deberán examinarse muestras incluidas en plástico de tejido de nervios periféricos. Según los signos clínicos que aparezcan podrán examinarse otros tejidos o utilizarse procedimientos de tinción especiales. En (3) y (4) se dan orientaciones sobre otros tejidos que pueden examinarse. Pueden ser útiles también (18) otros colorantes especiales para demostrar determinados tipos de alteraciones patológicas.

Se someterán a examen histológico secciones representativas de los sistemas nerviosos central y periférico (véase la referencia 3 del capítulo 5 y la referencia 4 del capítulo 50). Las zonas examinadas tienen que incluir normalmente: el prosencéfalo, el centro del cerebro, incluida una sección del hipocampo, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia anular, el bulbo raquídeo, el ojo con el nervio óptico y la retina, la médula espinal en los engrosamientos cervical y lumbar, los ganglios de la raíz dorsal, las fibras de la raíz ventral y dorsal, el nervio ciático en su parte próxima (en la rodilla) y el nervio tibial en sus ramificaciones del músculo de la pantorrilla. Las secciones de la médula espinal y de los nervios periféricos tienen que incluir tanto una sección transversal como una longitudinal. Debe prestarse atención a la vasculatura del sistema nervioso. Se examinará también una muestra de músculo esquelético, especialmente del de la pantorrilla. Hay que prestar especial atención a las zonas de los sistemas nerviosos central y periférico con estructura celular y fibrosa que se sabe que resultan particularmente afectadas por neurotóxicos.

En las referencias (3) y (4) se dan orientaciones sobre las alteraciones neuropatológicas que derivan normalmente de la exposición a sustancias tóxicas. Se recomienda un examen por fases de las muestras de tejido empezando por una comparación de las secciones del lote de dosis alta con las del lote testigo. Si no se observan alteraciones neuropatológicas en las muestras de estos lotes, no se requieren más análisis. Si se observan alteraciones neuropatológicas en el lote de dosis alta, deben codificarse y examinarse secuencialmente muestras de cada uno de los tejidos posiblemente afectados pertenecientes a los lotes de dosis intermedia y baja.

Si en el examen cualitativo se encuentran pruebas de alteraciones neuropatológicas, se realizará otro examen en todas las regiones del sistema nervioso que muestren estas alteraciones. Deberán codificarse y examinarse al azar, sin conocimiento del código, secciones de todos los lotes de cada una de las regiones posiblemente afectadas. Debe registrarse la frecuencia y gravedad de cada lesión. Después de que todos los lotes hayan sido clasificados, puede revelarse el código y entonces pueden hacerse análisis estadísticos para evaluar relaciones dosis-respuesta. Deberán darse ejemplos que muestren diferentes niveles de gravedad de cada lesión.

Los resultados neuropatológicos tienen que evaluarse en el contexto de observaciones y mediciones del comportamiento, así como en relación con otros datos de estudios de toxicidad sistémica de la sustancia anteriores y realizados al mismo tiempo.

2 **RESULTADOS**

2.1 **TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, tienen que resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo o testigo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de los signos observados, con inclusión

del momento de su aparición, la duración y la gravedad de los efectos tóxicos, el número de animales que presenten lesiones, y el tipo y la gravedad de las lesiones.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio deben evaluarse en lo que se refiere a la incidencia, gravedad y correlación de los efectos neurocomportamentales y neuropatológicos (así como a los efectos electrofisiológicos y neuroquímicos si se incluyen exámenes complementarios) y a cualquier otro efecto adverso observado. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y de amplia aceptación. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3 INFORME

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Sustancia estudiada:

- naturaleza física (incluyendo isomerismo, pureza y propiedades fisicoquímicas);
- identificación química,

Vehículo (si procede):

- motivación de la elección del vehículo;

Animales sometidos a ensayo:

- especie y cepa utilizadas;
- número, edad y sexo de los animales;
- procedencia, condiciones de alojamiento, aclimatación, dieta, etc.
- peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

- datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;
- especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado
- datos de la administración de la sustancia de ensayo;
- justificación de la selección de la dosis;
- justificación de la vía y la duración de la exposición;
- factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede;
- datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Procedimientos de observación y prueba:

- información detallada sobre la asignación de los animales de cada grupo a los subgrupos de perfusión;
- información detallada sobre los sistemas de puntuación, incluyendo criterios y escalas de puntuación para cada medición dentro de las observaciones clínicas detalladas;
- información detallada sobre las pruebas funcionales de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos); para la evaluación de la fuerza de prensión; para la evaluación de la actividad motriz (incluida información detallada sobre dispositivos automáticos para la detección de actividad); y otros procedimientos empleados;
- información detallada acerca de los exámenes oftalmológicos y, en su caso, los exámenes hematológicos y las pruebas bioquímicas clínicas con valores de referencia pertinentes;
- información detallada sobre procedimientos neurocomportamentales, neuropatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos.

Resultados:

- peso corporal/cambios en el peso corporal, incluyendo peso corporal en el momento del sacrificio;
- consumo de alimentos y de agua, en su caso;
- datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad y mortalidad;
- naturaleza, gravedad y duración (momento de aparición y evolución posterior) de las observaciones clínicas detalladas (reversibles o no);
- descripción pormenorizada de todos los resultados de las pruebas funcionales;
- resultados de la autopsia;
- descripción detallada de todos los resultados neurocomportamentales, neuropatológicos y neuroquímicos o electrofisiológicos, si se conocen;
- datos sobre la absorción, si los hay
- tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados

- información sobre la respuesta a la dosis;
- relación entre otros efectos tóxicos y la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia de ensayo;
- nivel sin efectos adversos observados

Conclusiones

- Se considera conveniente una declaración concreta sobre la neurotoxicidad general de la sustancia estudiada.

4

BIBLIOGRAFÍA

1. OCDE OCDE
2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/ London.
5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, **40**, 999-1003.
6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, **2**, 691-704.
7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, **108**, 267-283.
8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, **1**, 233-236.
9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, **13**, 599-609.
10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.
11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.
12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, **10**, 689-695.
13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, **18**, 343-352.
14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, **10**, 445-452.
15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 368-378.
16. Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.
17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.
18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Cuadro 1

Número mínimo de animales por grupo cuando el estudio de neurotoxicidad se realiza por separado o en combinación con otros estudios

| | ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD | | | |
|--|---------------------------|-------------------------------------|--|--|
| | como estudio aparte | combinado con el estudio de 28 días | combinado con el estudio de 90 días | combinado con el estudio de toxicidad crónica |
| Número total de animales por lote | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras | 15 machos y 15 hembras | 25 machos y 25 hembras |
| Número de animales seleccionados para pruebas funcionales incluidas observaciones clínicas detalladas | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras |
| Número de animales seleccionados para perfusión <i>in situ</i> y neurohistopatología | 5 machos y 5 hembras | 5 machos y 5 hembras | 5 machos y 5 hembras | 5 machos y 5 hembras |
| Número de animales seleccionados para observaciones de toxicidad por administración continuada/subcrónica/crónica, hematología, bioquímica clínica, histopatología, etc. según lo indicado en las respectivas <i>Orientaciones</i> . | | 5 machos y 5 hembras | 10 machos [†] y 10 hembras [†] | 20 machos [†] y 20 hembras [†] |
| Observaciones complementarias, según corresponda | 5 machos y 5 hembras | | | |

[†] - Incluye cinco animales seleccionados para pruebas funcionales y observaciones clínicas detalladas dentro del estudio de neurotoxicidad

Cuadro 2

Frecuencia de las observaciones y pruebas funcionales

| Tipo de observaciones | | Duración del estudio | | | |
|--|-----------------------------------|--|--|--|---|
| | | T. aguda | 28 días | 90 días | T. crónica |
| En todos los animales | Estado general de salud | diariamente | diariamente | diariamente | diariamente |
| | Mortalidad/morbilidad | dos veces al día | dos veces al día | dos veces al día | dos veces al día |
| En animales seleccionados para observaciones funcionales | Observaciones clínicas detalladas | - antes de la primera exposición - dentro de las 8 horas siguientes a la administración en el momento estimado del efecto más agudo - el día 7 y 14 después de la administración | - antes de la primera exposición - una vez por semana a continuación | - antes de la primera exposición - una vez durante la primera o segunda semana de exposición - mensualmente a continuación | - antes de la primera exposición - una vez al final del primer mes de exposición - cada tres meses a continuación |
| | Pruebas funcionales | - antes de la primera exposición - dentro de las 8 horas siguientes a la administración en el momento estimado del efecto más agudo - el día 7 y 14 después de la administración | - antes de la primera exposición - durante la cuarta semana de tratamiento tan cerca como sea posible del final del periodo de exposición | - antes de la primera exposición - una vez durante la primera o segunda semana de exposición - mensualmente a continuación | - antes de la primera exposición - una vez al final del primer mes de exposición - cada tres meses a continuación |

ANEXO 2H

B.42. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: PRUEBA CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES

1. MÉTODO

Este método de evaluación es equivalente al método TG 429 de la OCDE (2002)

1.1 INTRODUCCIÓN

El ensayo con ganglios linfáticos locales (*Local Lymph Node Assay*, LLNA) ha sido suficientemente validado y aceptado para justificar su adopción como nuevo método (1)(2)(3). Se trata del segundo método para evaluar el poder de sensibilización cutánea de productos químicos en animales. En el otro método (B.6) se utilizan estudios con cobayas, sobre todo el método de ensayo de maximización en cobayas y el método de ensayo de Buehler (4).

El LLNA constituye un método alternativo para la identificación de productos químicos que producen sensibilización cutánea, y para confirmar que los productos químicos carecen de un potencial significativo de producirla. Esto no significa necesariamente que la LLNA deba sustituir en todos los casos a estudios con cobayas, sino que posee la misma capacidad y se puede utilizar como alternativa en que, por lo general, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior.

El LLNA aporta ciertas ventajas en lo que respecta al progreso científico y al bienestar de los animales. Estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea, y aporta datos cuantitativos adecuados para evaluar la respuesta a la dosis. Los detalles de la validación del LLNA y una revisión de los trabajos relacionados ya han sido publicados (5)(6)(7)(8). Hay que señalar, además, que los sensibilizantes leves a moderados, que se recomiendan como sustancias de control positivo adecuadas en los métodos de ensayo con cobayas, también son adecuados para el LLNA (6)(8)(9).

El LLNA es un método *in vivo*, por lo que no eliminará el uso de animales para la evaluación de la actividad de sensibilización por contacto. No obstante, puede reducir el número de animales necesarios para este fin. Además supone un refinamiento sustancial de la forma de utilizar los animales en los ensayos de sensibilización por contacto. El LLNA se basa en la consideración de acontecimientos inmunológicos estimulados por productos químicos durante la fase de inducción de la sensibilización. Al contrario que los ensayos que utilizan cobayas, el LLNA no necesita provocar reacciones cutáneas de sensibilidad. Tampoco exige el uso de adyuvantes, como ocurre en el método de ensayo de maximización con cobayas. Por consiguiente, el LLNA reduce las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone con respecto a los ensayos tradicionales con cobayas, hay que reconocer que el LLNA tiene ciertas limitaciones que puede obligar a utilizarlas (por ejemplo, los resultados falsos negativos que se producen en el LLNA con determinados metales, los falsos positivos con algunos irritantes cutáneos) (10).

Véase también la introducción de la parte B.

1.2 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

El principio básico que subyace en el LLNA es que los sensibilizantes inducen una proliferación primaria de linfocitos en el ganglio linfático que drena la zona de aplicación del producto químico. Esta proliferación es proporcional a la dosis aplicada (y a la potencia del alérgeno) y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa y objetiva de la sensibilización. El LLNA evalúa esta proliferación como si fuera una relación de respuesta a la dosis, en la que se compara la proliferación en los grupos de ensayo con la observada en los controles tratados con un vehículo. Se determina lo que se conoce como índice de estimulación, que es la proporción existente entre la proliferación observada en los grupos tratados y la observada en los controles tratados con vehículo; dicho índice debe alcanzar un valor mínimo de tres para que una sustancia pueda ser sometida a una posterior evaluación como posible sensibilizante cutáneo. Los métodos que se describen aquí se basan en el uso de marcado radiactivo para medir la proliferación celular. Pero se pueden utilizar otros criterios para valorar la proliferación, siempre que se disponga del correspondiente fundamento científico, con toda la bibliografía y la correspondiente descripción de la metodología.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN

1.3.1 Preparativos

1.3.1.1 *Condiciones de alojamiento y alimentación*

Los animales deben ser alojados de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22° C ($\pm 3^\circ$ C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30% como mínimo y preferiblemente no superar el 70%, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60%. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

1.3.1.2 *Preparación de los animales*

Se eligen los animales al azar, se les marca para su identificación individual (pero no en las orejas) y permanecen en sus jaulas al menos 5 días antes de la administración, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

1.3.2 Condiciones del ensayo

1.3.2.1 *Animales de experimentación*

El ratón es la especie elegida para este ensayo. Se utilizan hembras adultas jóvenes de las cepas CBA/Ca o CBA/J, nulíparas y que no estén preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínimo, sin superar el

20% del peso medio. Se podrán utilizar otras cepas y machos, cuando se aporten datos suficientes para demostrar que no existen diferencias significativas específicas de la cepa o del sexo en la respuesta LLNA.

1.3.2.2 *Verificación de la fiabilidad*

Se utilizan controles positivos para demostrar que el funcionamiento del ensayo es adecuado, y la competencia del laboratorio para realizarlo con éxito. El control positivo debe dar una respuesta LLNA positiva con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del índice de estimulación (IE) >3 con respecto al grupo de control negativo. La dosis del control positivo debería elegirse de tal manera que la inducción sea evidente, pero no excesiva. Las sustancias preferidas son el aldehído hexilcinámico (CAS N° 101-86-0, EINECS n° 202-983-3) y el mercaptobenzotiazol (CAS N° 149-30-4, EINECS n° 205-736-8). En algunas circunstancias se pueden utilizar otras sustancias de control, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados. Aunque normalmente se necesita un grupo de control positivo en cada ensayo, puede haber situaciones en las que los laboratorios de ensayos dispongan de datos históricos de controles positivos, que demuestren la uniformidad de una respuesta satisfactoria durante un período de seis meses o más. En tales situaciones puede estar indicado hacer menos ensayos con controles positivos, en intervalos que no superen los 6 meses. Aunque la sustancia de control positivo debe ser evaluada en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario evaluar en un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico). En tal caso habrá que evaluar la posible interacción del control positivo con este vehículo no convencional.

1.3.2.3 *Número de animales, niveles de dosis y selección del vehículo.*

Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia en estudio, más un grupo de control negativo tratado sólo con el vehículo utilizado con la sustancia analizada y en su caso, un control positivo. Cuando se vayan a recoger datos de animales individuales será necesario un mínimo de cinco animales por grupo de dosis. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia de ensayo, los animales de los grupos control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

La elección de la dosis y el vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en la referencia (1). Las dosis se eligen a partir de series de concentraciones del 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5% etc. Para elegir las tres concentraciones consecutivas se tendrán en cuenta los datos existentes sobre toxicidad aguda e irritación cutánea, en su caso, de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (2)(11).

El vehículo se elegirá de forma que se logre la máxima concentración y solubilidad de la sustancia analizada con una relación solución/suspensión adecuada para la aplicación de la sustancia. Los vehículos recomendados son, por orden de preferencia, acetona/aceite de oliva (4:1 v/v), dimetilformamida, metil etil cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (2)(10), pero se pueden utilizar otros si se aportan la correspondiente justificación científica. En determinadas situaciones puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en garantizar que se incorporan materiales hidrófilos al sistema del vehículo, pues humedecen la piel y no se pierden inmediatamente. Por eso se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

1.3.3 **Procedimiento de ensayo**

1.3.3.1 *Calendario del experimento*

El calendario del experimento es el siguiente:

- *Día 1:*
Se identifica cada animal y se toma nota del peso. En el dorso de cada oreja se hace una aplicación abierta de 25 µl de la apropiada dilución de la sustancia en estudio, del vehículo solo o del control positivo (si procede).
- *Días 2 y 3:*
Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.
- *Días 4 y 5:*
Sin tratamiento.
- *Día 6:*
Se toma nota del peso de cada animal. Se inyectan 250 µl de suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contenga 20 µCi (7,4e + 8 Bq) de ³H-metil timidina a todos los ratones (de evaluación y de control) a través de la vena de la cola. También se pueden inyectar 250 µL de PBS con 2 µCi (7,4e + 7 Bq) de ¹²⁵I-yododesoxiuridina y fluorodesoxiuridina 10⁻⁵ M a todos los ratones a través de la vena de la cola.

Cinco horas después se sacrifica a los animales. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja y se agrupan en PBS por cada grupo de experimentación (enfoque de agrupación por grupo de tratamiento); también se pueden extirpar pares de ganglios linfáticos de animales individuales y agruparlos en PBS por animal (enfoque de animales individuales). En el Anexo I de la referencia 10 se recogen los detalles de la identificación y disección de los ganglios, con dibujos explicativos.

1.3.3.2 *Preparación de suspensiones celulares*

Se prepara una única suspensión de células de ganglios linfáticos (CGL) a partir de los grupos de tratamiento agrupados o bilateralmente de animales individuales, mediante disgregación mecánica suave con una malla de acero inoxidable de 200 µm. Se lavan las CGL dos veces con PBS en exceso y se hacen precipitar con ácido tricloroacético (ATC) al 5% a 4 °C durante 18 horas (1). A continuación el sedimento se vuelve a suspender en 1 ml de ATC y se traslada a viales de gammagrafía con 10 ml de líquido de gammagrafía para el recuento de ³H, o se transfieren directamente a tubos de recuento gamma para el recuento de ¹²⁵I.

1.3.3.3 *Determinación de la proliferación celular (radiactividad incorporada)*

La incorporación de ³H-metil timidina se mide por gammagrafía-β, que cuenta las desintegraciones por minuto (DPM). La incorporación de ¹²⁵I-yododesoxiuridina se mide por el recuento de ¹²⁵I y también se expresa en DPM. Dependiendo del enfoque utilizado, la incorporación se expresará como DPM/grupo de tratamiento (enfoque acumulado) o como DPM/animal (enfoque individual).

1.3.3.4 *Observaciones*

1.3.3.4.1 *Observaciones clínicas*

Una vez al día se realizará una observación minuciosa de los animales en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se anotará sistemáticamente en los registros individuales abiertos para cada animal.

1.3.3.4.2 *Peso corporal*

Como se indica en la sección 1.3.3.1 hay que medir el peso corporal individual de los animales al empezar el ensayo y en el momento del sacrificio de los animales.

1.3.4 **Cálculo de resultados**

Los resultados se expresan por el índice de estimulación (IE). Si se emplea el enfoque por acumulación, el IE se obtiene dividiendo la incorporación de radiactividad acumulada en cada grupo de tratamiento por la incorporación acumulada en el grupo de control con vehículo; así se obtiene un IE medio. Si se emplea el enfoque individual, el IE se obtiene dividiendo la media de DPM/animal de cada grupo de tratamiento y la del control positivo por la media de DPM/animal del grupo de control con vehículo o disolvente. De esta forma, el IE promedio para controles tratados con vehículo es 1.

El uso del enfoque individual para calcular el IE permite realizar un análisis estadístico de los datos. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado el investigador debe conocer las posibles irregularidades de las variancias y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. Un enfoque adecuado para interpretar los datos consiste en evaluar todos los datos individuales de los animales tratados y los de control con vehículo, y derivar de ellos la curva de respuesta a la dosis más adecuada, teniendo en cuenta los límites de confianza (8)(12)(13). No obstante el investigador debe estar alerta a las posibles respuestas "fuera de los límites" en animales individuales de un grupo, que pueden obligar a utilizar otra forma de medir la respuesta (por ejemplo, la mediana en lugar de la media) o a eliminar a los que quedan fuera de los límites.

El proceso de decisiones con respecto a la respuesta positiva incluye un índice de estimulación ≥ 3 junto con la consideración de la respuesta a la dosis y de la significación estadística, en su caso (3)(6)(8)(12)(14).

Si fuera necesario aclarar los resultados obtenidos, se tendrán en cuenta diversas propiedades de la sustancia analizada, como si tiene relación estructural con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce irritación cutánea excesiva y la naturaleza de la respuesta a la dosis observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro punto (7).

2 **DATOS**

Los datos se resumirán en tablas, con los valores medios e individuales de DPM y los índices de estimulación de cada grupo de dosis (incluido el de control con vehículo).

3 **NOTIFICACIÓN**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancia analizada:

- datos de identificación (por ejemplo, número CAS, si procede; origen; pureza; impurezas conocidas; número de lote);
- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo volatilidad, estabilidad, solubilidad);
- si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Vehículo:

- datos de identificación [pureza; concentración (en su caso); volumen utilizado]
- justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

- cepa de ratones utilizada;
- situación microbiológica de los animales, si se conoce;
- número, edad y sexo de los animales;
- origen de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del análisis:

- detalles de la preparación y aplicación de la sustancia analizada;
- justificación de la dosis elegida, con los resultados del estudio de determinación de dosis, si se ha efectuado; concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia analizada, y cantidad total de sustancia aplicada
- detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la dieta y el origen del agua).

Verificación de la fiabilidad:

- resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia, la concentración y el vehículo utilizados.
- datos de control positivo y negativo concurrentes o históricos del laboratorio encargado del análisis

Resultados:

- peso individual de los animales al inicio del tratamiento y en el momento del sacrificio.
- tabla con los valores de DPM medias (enfoque acumulado) y individuales (enfoque individual) así como la gama de valores para los dos enfoques y los índices de estimulación de cada grupo de dosis (incluido el de control con vehículo).
- análisis estadístico, en su caso
- evolución cronológica del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración en cada animal, en su caso.

Comentario de los resultados:

- Breve comentario de los resultados, análisis de la respuesta a la dosis y análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia analizada debe ser considerada sensibilizante cutáneo.

4

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165-169.
- 2 Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93, 13-31.
- 3 Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563-79.
- 4 Testing Method B.6.
- 5 Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999-1002.
- 6 Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985-997.
7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 327-33.
- 8 Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49-59.
- 9 Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281-4.
- 10 National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11 Testing method B.4.
- 12 Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63-67.
- 13 Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261-266.
- 14 Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42 ,344-48.

C.22. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBONO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 217 (2000).

1.1 INTRODUCCIÓN

En el presente método de ensayo se describe un método de laboratorio diseñado para investigar los efectos potenciales a largo plazo de una exposición única a productos fitosanitarios y posiblemente otras sustancias químicas sobre la actividad de transformación del carbono por los microorganismos del suelo. El ensayo se basa principalmente en las recomendaciones de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (1). Sin embargo, se han tenido en cuenta otras directrices, como las del Biologische Bundesanstalt (2) de Alemania, la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (3) y la SETAC (4). En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (5) se alcanzó un acuerdo sobre el número y tipos de suelos que deben utilizarse en estos ensayos. Las recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de suelo se basan en un documento orientativo de la ISO (6) y en las recomendaciones del seminario de Belgirate.

En la valoración y evaluación de las características de las sustancias de ensayo, puede resultar necesaria la determinación de los efectos de la actividad microbiana en el suelo, p. ej., cuando se requieran datos sobre los posibles efectos secundarios de los productos fitosanitarios en la microflora del suelo o cuando sea previsible la exposición de los microorganismos del suelo a productos químicos distintos de los fitosanitarios. El ensayo de transformación del carbono se lleva a cabo para determinar los efectos de estos productos químicos en la microflora del suelo. Si se ensayan productos agroquímicos (por ejemplo, productos fitosanitarios, abonos y productos químicos para la silvicultura), se llevarán a cabo tanto ensayos de transformación del carbono como del nitrógeno. Si se trata de productos no agroquímicos, es suficiente el ensayo de transformación del nitrógeno. Sin embargo, si los valores EC_{50} del ensayo de transformación del nitrógeno de estos productos químicos se sitúan dentro del intervalo encontrado para los inhibidores de la nitrificación disponibles en el comercio (p. ej., la nitrapirina), puede hacerse un ensayo de transformación del carbono para obtener más información.

Los suelos están formados por componentes vivos y no vivos que se dan en mezclas complejas y heterogéneas. Los microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y transformación de la materia orgánica en los suelos fértiles. Existen muchas especies que contribuyen de diversas maneras a la fertilidad del suelo. Cualquier interferencia a largo plazo en estos procesos bioquímicos podría perturbar el ciclo de los nutrientes y alterar la fertilidad del suelo. La transformación del carbono y del nitrógeno se da en todos los suelos fértiles. Aunque las comunidades microbianas responsables de estos procesos difieren de unos suelos a otros, las rutas de transformación son esencialmente las mismas.

Este método de ensayo está pensado para detectar los efectos negativos a largo plazo de una sustancia en el proceso de transformación del carbono en los suelos aerobios de superficie. El ensayo es sensible a alteraciones de la envergadura y la actividad de las comunidades microbianas responsables de la transformación del carbono, al someterlas a estrés químico y privación de carbono. Se utiliza un suelo arenoso con bajo contenido de materia orgánica. Se trata este suelo con la sustancia de ensayo y se incuba en condiciones que permitan un rápido metabolismo microbiano. En estas condiciones, las fuentes de carbono de fácil obtención se agotan rápidamente en el suelo. Este hecho ocasiona una privación de carbono que causa la muerte de las células microbianas e induce el letargo y/o la esporulación. Si el ensayo se prolonga durante más de 28 días, puede medirse la suma de estas reacciones en controles (de suelo no tratado) como pérdida progresiva de biomasa microbiana metabólicamente activa (7). Si la biomasa del suelo sometido a estrés de carbono, en las condiciones del ensayo, se ve afectada por la presencia de un producto químico, puede que no regrese al mismo nivel que el control. Por ello, las perturbaciones causadas por la sustancia de ensayo en cualquier momento de la realización de éste persistirán frecuentemente hasta su finalización.

Los ensayos a partir de los cuales se desarrolló este método estaban pensados principalmente para sustancias respecto a las cuales puede preverse la cantidad que llegará al suelo. Éste es el caso, por ejemplo, de los productos fitosanitarios, cuyo índice de aplicación en el campo es conocido. Para los productos agroquímicos, es suficiente el ensayo de dos dosis con arreglo al índice de aplicación estimado o previsto. Los productos agroquímicos pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados. Sin embargo, el ensayo no se limita a los productos químicos con concentraciones en el medio ambiente previsibles. Cambiando tanto las cantidades de la sustancia de ensayo aplicada al suelo como la manera en que se evalúan los datos, el ensayo puede usarse también para productos químicos de los cuales se desconozca la cantidad que llegará al suelo. De este modo, en el caso de los productos no agroquímicos, se determinan los efectos de una serie de concentraciones en la transformación del carbono. A continuación, se utilizan los datos de estos ensayos para trazar una curva dosis-respuesta y calcular los valores EC_x , donde x es el porcentaje de efecto definido.

1.2 DEFINICIONES

Transformación del carbono: es la degradación por microorganismos de la materia orgánica hasta formar dióxido de carbono como producto final.

EC_x (concentración efectiva): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un porcentaje x de inhibición de la transformación del carbono en dióxido de carbono.

EC_{50} (concentración efectiva mediana): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un 50% de inhibición de la transformación del carbono en dióxido de carbono.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se trata parte del suelo tamizado con la sustancia de ensayo y se deja otra sin tratar (control). Cuando se ensayen productos agroquímicos, se recomienda un mínimo de dos concentraciones de ensayo, que deberán elegirse en relación con la concentración más alta prevista sobre el terreno. Después de 0, 7, 14 y 28 días de incubación, se mezclarán muestras de suelos tratados y de control con glucosa y se medirán las tasas de respiración inducidas por la glucosa durante 12 horas consecutivas. Las tasas de respiración se expresan como dióxido de carbono liberado (mg dióxido de carbono/kg suelo seco/h) u oxígeno consumido (mg oxígeno/kg suelo/h). Se comparará la tasa de respiración en las muestras de suelo tratado con la de control y se calculará el porcentaje de desviación respecto a ésta. Todos los ensayos tendrán una duración mínima de 28 días. Si, al 28º día, la diferencia entre los suelos tratados y los no tratados es igual o superior al 25%, se continuarán las mediciones a intervalos de 14 días hasta un máximo de 100 días. Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se añadirá a las muestras de suelo una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo y se medirán al cabo de 28 días las tasas de respiración inducidas por glucosa (es decir, la media de las cantidades de dióxido de carbono formado u oxígeno consumido). Se analizarán los resultados de los ensayos con una serie de concentraciones utilizando un modelo de regresión y se calcularán los valores EC_x (es decir, EC_{50} , EC_{25} y/o EC_{10}). Véanse las definiciones.

1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Las evaluaciones de los resultados de los ensayos con productos agroquímicos se basan en diferencias relativamente pequeñas (de un valor medio de $\pm 25\%$) entre el dióxido de carbono liberado o el oxígeno consumido en (o por) las muestras de suelo tratado y de control, por lo que grandes variaciones en las muestras de control pueden dar lugar a resultados falsos. Por este motivo, la variación entre muestras de control en paralelo deberá ser inferior al $\pm 15\%$.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1 **Equipo**

Se utilizarán recipientes de ensayo hechos de material químicamente inerte. Estos recipientes deberán ser de capacidad adecuada de acuerdo con el procedimiento utilizado para la incubación de suelos, es decir, incubación en una muestra única o en una serie de muestras separadas (véase el apartado 1.7.1.2). Hay que procurar reducir al mínimo la pérdida de agua y permitir el intercambio de gas durante el ensayo (p. ej., pueden cubrirse los recipientes con láminas de polietileno perforado). Cuando se ensayen sustancias volátiles, deberán usarse recipientes sellables y herméticos cuyo tamaño sea tal que aproximadamente un cuarto de su volumen esté ocupado por la muestra de suelo.

Para la determinación de la respiración inducida por glucosa, se precisarán sistemas e instrumentos de incubación que permitan medir la producción de dióxido de carbono o el consumo de oxígeno. Se encontrarán ejemplos de este tipo de sistemas e instrumentos en la bibliografía (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Selección y número de suelos**

Se utilizará un único suelo cuyas características recomendadas serán las siguientes:

- contenido de arena: no inferior al 50% ni superior al 75%,
- pH: 5,5 - 7,5,
- contenido de carbono orgánico: 0,5 - 1,5%
- deberá medirse la masa microbiana (12)(13), cuyo contenido de carbono deberá ser al menos el 1% del total de carbono orgánico en el suelo.

En la mayoría de los casos, un suelo de estas características representa la situación más desfavorable, ya que la adsorción de la sustancia química de ensayo es mínima y su disponibilidad para la microflora es máxima. Por lo tanto, no son necesarios, por lo general, ensayos de otros suelos. Sin embargo, en algunas circunstancias, p. ej. cuando la sustancia de ensayo esté indicada principalmente para determinados suelos, como los suelos forestales ácidos, o en el caso de productos químicos cargados electrostáticamente, puede resultar necesario utilizar un suelo adicional.

1.6.3 **Recogida y conservación de muestras de suelo**

1.6.3.1 *Recogida*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del lugar donde se haya recogido el suelo de ensayo. En particular, localización precisa, cubierta vegetal, fechas de tratamiento con productos fitosanitarios, con abonos orgánicos e inorgánicos, adición de materiales biológicos o contaminación accidental. El lugar elegido para la recogida de suelo tiene que ser tal que permita un uso a largo plazo. Se consideran adecuados los pastos permanentes, los campos con cosechas anuales de cereales (excepto el maíz) o los abonos verdes sembrados densamente. El lugar donde se recojan las muestras no deberá haber sido tratado con productos fitosanitarios durante un mínimo de un año antes de la recogida de éstas. Además, no deberá haberse aplicado ningún abono orgánico durante al menos seis meses. El uso de abonos minerales sólo será aceptable cuando responda a las necesidades del cultivo, y en ese caso no deberán tomarse muestras hasta transcurridos, al menos, tres meses desde la aplicación del abono. Deberá evitarse el uso de suelo tratado con abonos de efectos biocidas conocidos (p. ej., cianamida de calcio).

Deberá evitarse la toma de muestras durante o inmediatamente después de períodos prolongados (de más de 30 días) de sequía o encharcamiento. En el caso de los suelos arados, deberán tomarse muestras a una profundidad de 0 a 20 cm. Cuando se trate de pastizales u otros suelos que no se aren durante períodos más largos (al menos un ciclo de cultivo), la profundidad máxima del muestreo podrá ser ligeramente superior a 20 cm (p. ej., 25 cm). La muestras de suelo se transportarán en recipientes y en condiciones de temperatura que garantizan que las propiedades iniciales del suelo no se alteren significativamente.

1.6.3.2 *Conservación*

Es preferible el uso de muestras de suelo recién recogidas. Si no se puede evitar el almacenamiento en el laboratorio, las muestras de suelo podrán guardarse en la oscuridad a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un máximo de tres meses. Durante el almacenamiento, deberá asegurarse el mantenimiento de unas condiciones aerobias. Si se recogen muestras de suelo de zonas que estén heladas durante, al menos, tres meses al año, podrá considerarse la posibilidad de almacenarlas durante seis meses a -18°C . Se medirá la biomasa microbiana de las muestras almacenadas antes de cada experimento. La cantidad de carbono en la biomasa deberá ser como mínimo el 1% del total de carbono orgánico de la muestra de suelo (véase el apartado 1.6.2).

1.6.4 **Manipulación y preparación del suelo para el ensayo**

1.6.4.1 *Preincubación*

Cuando las muestras de suelo hayan estado almacenadas (véanse apartados 1.6.4.2 y 1.7.1.3), se recomienda preincubar durante un período de entre 2 y 28 días. La temperatura y el contenido de humedad del suelo durante la preincubación deberán ser semejantes a las que se den durante el ensayo (véanse apartados 1.6.4.2 y 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Características fisicoquímicas*

Se separarán manualmente los objetos grandes (p. ej., piedras, trozos de plantas, etc.) de la muestra de suelo y, a continuación, se tamizará la muestra por vía húmeda sin secar en exceso para obtener un tamaño de las partículas no superior a 2 mm. Deberá ajustarse el contenido de humedad de la muestra con agua destilada o desionizada para llegar a un valor entre el 40% y el 60% de la capacidad de retención de agua máxima.

1.6.5 **Preparación de la sustancia de ensayo para la aplicación al suelo**

La sustancia de ensayo se aplica normalmente utilizando un vehículo. El vehículo podrá ser agua (para las sustancias solubles en el agua) o un sólido inerte como arena fina de cuarzo (tamaño de las partículas: 0,1 -0,5 mm). Se evitarán los vehículos líquidos distintos del agua (p. ej., disolventes orgánicos como la acetona o el cloroformo), porque pueden dañar la microflora. Si se usa arena como vehículo, podrá recubrirse con la sustancia de ensayo disuelta o suspendida en un disolvente apropiado. En tal caso, deberá eliminarse el disolvente por evaporación antes de mezclarse con la muestra de suelo. Para una distribución óptima de la sustancia de ensayo en el suelo, se recomienda una proporción de 10 g de arena por kilo de suelo (peso en seco). Las muestras de control se tratarán sólo con la cantidad equivalente de agua y/o arena de cuarzo.

Cuando se ensayen sustancias químicas volátiles, deberán evitarse las pérdidas durante el tratamiento y se procurará conseguir una distribución homogénea en la muestra de suelo (p. ej., deberá inyectarse la sustancia de ensayo en la muestra en varios sitios).

1.6.6 **Concentraciones de ensayo**

Si se someten a ensayo productos fitosanitarios u otros productos químicos cuyas concentraciones en el medio ambiente sean predecibles, deberán utilizarse al menos dos concentraciones. La concentración más baja corresponderá, al menos, a la cantidad máxima que se prevé que llegue al suelo en la práctica, y la concentración más alta será un múltiplo de la concentración más baja. Las concentraciones de la sustancia de ensayo añadida al suelo se calcularán suponiendo una incorporación uniforme hasta una profundidad de 5 cm y una densidad aparente del suelo de 1,5. Para los productos agroquímicos que se aplican directamente al suelo o para las sustancias químicas para las cuales puede predecirse la cantidad que llega al suelo, las concentraciones de ensayo recomendadas son la concentración ambiental prevista (PEC) y cinco veces esa concentración. Las sustancias destinadas a ser aplicadas a los suelos varias veces en la misma temporada se ensayarán a las concentraciones resultantes de multiplicar la PEC por el número máximo de aplicaciones previsto. Sin embargo, la concentración máxima ensayada no deberá superar diez veces el índice máximo para una aplicación.

Si se ensayan productos no agroquímicos, se empleará una serie geométrica de, al menos, cinco concentraciones. Las concentraciones ensayadas deberán cubrir el intervalo necesario para determinar los valores EC_x .

1.7 **REALIZACIÓN DEL ENSAYO**

1.7.1 **Condiciones de exposición**

1.7.1.1 *Tratamiento y control*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en tres partes de igual peso. Dos partes se mezclarán con el vehículo que contenga el producto, y la otra, con el vehículo sin el producto (control). Se recomienda un mínimo de tres ejemplares para ambos tipos de muestras, las tratadas y las no tratadas. Cuando se ensayen productos no agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en seis partes de igual peso. Cinco de las muestras se mezclarán con el vehículo que contenga la sustancia de ensayo, y la sexta, con el vehículo sin la sustancia. Se recomienda preparar tres ejemplares tanto para las muestras tratadas como las de control. Deberá procurarse una distribución homogénea de la sustancia de ensayo en las muestras tratadas. Durante la mezcla, se evitará la compactación de la muestra o la formación de grumos.

1.7.1.2 *Incubación de las muestras de suelo*

La incubación de las muestras de suelo puede hacerse de dos maneras: como dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, o como una serie de submuestras de igual tamaño de suelo tratado, por una parte, y de suelo no tratado, por otra. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, sólo deberá hacerse el ensayo con una serie de submuestras separadas. Cuando las muestras de suelo se incuben en una muestra única, se prepararán grandes cantidades de suelo tratado y no tratado, y se tomarán las submuestras que deban analizarse según se necesite a lo largo del ensayo. La cantidad preparada inicialmente para las muestras tratadas y para las de control dependerá del tamaño de las submuestras, el número de ejemplares utilizados para el análisis y el número máximo previsto de períodos de muestreo. Deberán mezclarse bien las muestras de suelo incubadas como muestra única antes de preparar las submuestras. Cuando la incubación se haga en una serie de muestras separadas, se dividirán las dos muestras, de suelo tratado y de suelo no tratado, en el número de submuestras requerido, y éstas se utilizarán según se necesite. En los experimentos en los que puedan preverse más de dos tiempos de muestreo, habrán de prepararse las submuestras suficientes, teniendo en cuenta los ejemplares y los tiempos de muestreo. Deberán incubarse, al menos, tres ejemplares de las muestras de ensayo en condiciones aerobias (véase el apartado 1.7.1.1). Durante todos

los ensayos, se utilizarán recipientes adecuados con suficiente espacio libre para evitar la aparición de condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, sólo deberá realizarse el ensayo con una serie de submuestras separadas.

1.7.1.3 *Condiciones y duración del ensayo*

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. El contenido de humedad de las muestras se mantendrá durante el ensayo entre el 40% y el 60% de la capacidad de retención de agua máxima del suelo (véase el apartado 1.6.4.2) con una variación máxima del $\pm 5\%$. Podrá añadirse agua destilada y desionizada según se necesite.

La duración mínima del ensayo será de 28 días. Si se están ensayando productos agroquímicos, se compararán las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en las muestras tratada y de control. Si difieren en más del 25% al 28º día, se continuará el ensayo hasta que se obtenga una diferencia igual o menor al 25% o bien durante un máximo de 100 días. En el caso de los productos no agroquímicos, se pondrá fina al ensayo a los 28 días. Al 28º día, se determinarán las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en las muestras tratada y de control y se calcularán los valores EC_x .

1.7.2 **Toma de muestras y análisis de suelos**

1.7.2.1 *Calendario de toma de muestras*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, se hará el análisis de tasas de respiración inducida por glucosa en las muestras de suelo los días 0, 7, 14 y 28. Cuando se necesite un ensayo prolongado, se efectuarán nuevas mediciones a intervalos de 14 días a partir del 28º día.

Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se utilizarán como mínimo cinco concentraciones de ensayo y se hará el análisis de la respiración inducida por glucosa en las muestras de suelo al principio (día 0) y al final del período de exposición (28 días). Si se considera necesario, podrá añadirse una medición intermedia, p. ej., al séptimo día. Se utilizarán los datos obtenidos al 28º día para hallar el valor EC_x de la sustancia química. Si se desea, podrán utilizarse los datos de las muestras de control obtenidos el día 0 para estimar las cantidades iniciales de biomasa microbiana metabólicamente activa en el suelo (12).

1.7.2.2 *Medida de las tasas de respiración inducida por glucosa*

Se determinará la tasa de respiración inducida por glucosa en cada ejemplar de muestra tratada y de control en cada momento de muestreo. Se mezclarán las muestras de suelo con una cantidad de glucosa suficiente para suscitar una respuesta respiratoria máxima inmediata. Dicha cantidad de glucosa necesaria para suscitar una respuesta respiratoria máxima en un suelo dado puede determinarse en un ensayo preliminar utilizando una serie de concentraciones de glucosa (14). Sin embargo, en el caso de suelos arenosos con 0,5-1,5% de carbono orgánico, suelen resultar suficientes de 2000 mg a 4000 mg de glucosa por kg de suelo (peso en seco). Es posible obtener un polvo mezclando la glucosa con arena de cuarzo limpia (10 g de arena/kg de suelo, peso en seco) y mezclarlo con el suelo de manera homogénea.

Se incubarán las muestras de suelo enmendadas con glucosa en un aparato adecuado para medir las tasas de respiración continuamente, cada hora o cada dos horas (véase apartado 1.6.1) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Se medirá el dióxido de carbono liberado o el oxígeno consumido durante 12 horas consecutivas, iniciándose las medidas lo antes posible, es decir, de 1 a 2 horas después de añadido el suplemento de glucosa. Se medirán las cantidades totales de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido durante las 12 horas y se determinarán las tasas de respiración promedio.

2 **RESULTADOS**

2.1 **TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

Si se trata de productos agroquímicos, deberán registrarse las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en cada ejemplar de muestra de suelo, tabulándose además los valores promedio de todos los ejemplares. Se evaluarán los resultados mediante métodos estadísticos apropiados y generalmente aceptables (p. ej., prueba F, nivel de significación del 5%). Las tasas de respiración inducida por glucosa se expresan en mg de dióxido de carbono/kg suelo, peso en seco/h o en mg oxígeno/suelo, peso en seco/h. Se comparará la tasa promedio de formación de dióxido de carbono o la tasa promedio de consumo de oxígeno en cada tratamiento con la de control, calculándose la desviación porcentual con respecto al control.

Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se determinarán las cantidades de dióxido de carbono liberadas o de oxígeno consumidas por cada ejemplar y se trazará una curva dosis-respuesta para estimar los valores EC_x . Se compararán las tasas de respiración inducida por glucosa (es decir, mg de dióxido de carbono/kg suelo, peso en seco/h o mg oxígeno/suelo, peso en seco/h) que presenten las muestras tratadas transcurridos 28 días con las que presenten las muestras de control. A partir de estos datos, se calcularán los valores porcentuales de inhibición para cada concentración de ensayo. Se representarán gráficamente estos porcentajes frente a la concentración, utilizándose luego procedimientos estadísticos para calcular los valores EC_x . Utilizando asimismo procedimientos estándar, se determinarán los límites de confianza ($p = 0,95$) para los EC_x calculados (10)(11)(12).

2.2 **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Cuando se evalúen los resultados de los ensayos con productos agroquímicos y la diferencia en las tasas de respiración entre el tratamiento más bajo (es decir, la concentración máxima prevista) y la muestra de control no supere el 25% en ningún momento de muestreo a partir del 28º día, podrá considerarse que el producto no tiene influencia a largo plazo en la transformación de carbono en el suelo. Cuando se evalúen los resultados de ensayos con productos no agroquímicos, se utilizarán los valores EC_{50} , EC_{25} y/o EC_{10}

3 INFORME**INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Identificación completa del suelo utilizado, incluyendo:

- referencia geográfica del lugar (latitud y longitud),
- información sobre la historia del lugar (es decir, cubierta vegetal, tratamientos con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos, contaminación accidental, etc.),
- tipo de uso (p. ej., suelo agrícola, bosque, etc.),
- profundidad de muestreo (cm),
- contenido de arena/limo/arcilla (% peso seco),
- pH (en agua),
- contenido de carbono orgánico (% peso seco),
- contenido de nitrógeno (% peso seco),
- capacidad de intercambio de cationes (mmol/kg),
- biomasa microbiana inicial en porcentaje del carbono orgánico total,
- referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro,
- toda la información sobre la recogida y almacenamiento de las muestras de suelo,
- datos de la preincubación del suelo, si procede.

Sustancia de ensayo:

- naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,
- identificación química, en su caso, incluyendo fórmula estructural, pureza (es decir, en el caso de los productos fitosanitarios, el porcentaje de principio activo) y contenido de nitrógeno.

Condiciones de ensayo:

- información sobre la adición al suelo de sustrato orgánico,
- número de concentraciones de la sustancia de ensayo utilizadas y, en su caso, justificación de las concentraciones seleccionadas,
- datos de la aplicación de la sustancia de ensayo al suelo,
- temperatura de incubación,
- contenido de humedad al principio y durante el ensayo,
- método de incubación del suelo utilizado (es decir, muestra única o serie de submuestras separadas),
- número de ejemplares,
- tiempos de muestreo.

Resultados:

- método y equipo utilizados para medir las tasas de respiración,
- datos tabulados, incluyendo los distintos valores y los valores promedio de las cantidades de dióxido de carbono u oxígeno,
- variación entre los ejemplares de las muestras tratadas y las muestras de control,
- explicación de la correcciones efectuadas en los cálculos, si procede,
- variación porcentual de las tasas de respiración inducida por glucosa en cada momento de muestreo o, si procede, el valor EC_{50} con un límite de confianza del 95%, otros valores EC_x (es decir, EC_{25} o EC_{10}) con intervalos de confianza, y una gráfica de la curva dosis-respuesta,
- tratamiento estadístico de los resultados, si procede;
 - cualquier información u observación complementaria de interés para la interpretación de los resultados.

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis - Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality - Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.23. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN EL SUELO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 307 (2002).

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método se basa en las actuales directrices (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). El método está pensado para evaluar la transformación aerobia y anaerobia de las sustancias químicas en el suelo. Con los experimentos se pretende determinar: i) la tasa de transformación de la sustancia de ensayo, y ii) la naturaleza y las tasas de formación y disminución de los productos de transformación a los que pueden estar expuestos los vegetales y los organismos del suelo. Se precisa de dichos estudios para las sustancias químicas que se aplican directamente al suelo o es probable que alcancen el medio edáfico. Los resultados de los estudios puede utilizarse igualmente para elaborar protocolos de muestreo y análisis para estudios de campo afines.

Por regla general, para evaluar las vías de transformación bastará efectuar estudios aerobios y anaerobios con un tipo de suelo (8)(10)(11). Las tasas de transformación, sin embargo, deberán determinarse por lo menos en otros tres suelos (8)(10).

En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (10) se alcanzó un acuerdo, en particular, sobre el número y tipos de suelos que deben utilizarse en estos ensayos. Los tipos de suelos sometidos a ensayo deben ser representativos de las condiciones ambientales en las que tendrá lugar el uso o la liberación. Por ejemplo, las sustancias químicas que vayan a liberarse en climas tropicales o subtropicales deben ensayarse en ferralsoles y nitosoles (sistema FAO). Dicho seminario formuló asimismo recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de suelos (15). También se examina en este método el uso de suelos de (arroz) paddy.

1.2 DEFINICIONES

Sustancia de ensayo: cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

Productos de transformación: todas las sustancias resultantes de las reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia de ensayo, incluido el CO₂ y los productos que se encuentran en los residuos ligados.

Residuos ligados: compuestos del suelo, la planta o el animal que persisten en la matriz en forma de sustancia original o de sus productos de transformación /metabolitos tras la extracción. El método de extracción no debe modificar sustancialmente ni los propios compuestos ni la estructura de la matriz. La naturaleza del vínculo puede aclararse parcialmente mediante métodos de extracción que alteren la matriz y técnicas analíticas sofisticadas. Así por ejemplo, hasta la fecha se han identificado de esta manera enlaces covalentes, iónicos y de sorción, así como atrapamientos. En general, la formación de residuos ligados reduce de manera significativa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (12) [modificado de IUPAC 1984 (13)].

Transformación aerobia: reacciones que se producen en presencia de oxígeno molecular (14).

Transformación anaerobia: reacciones que se producen en ausencia de oxígeno molecular (14).

Suelo: mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado, animados por pequeños organismos (principalmente microorganismos). El suelo puede manipularse en dos estados:

- a) no perturbado, tal como se ha desarrollado en el tiempo, en capas características de diversos tipos de suelo,
- b) perturbado, como suele encontrarse en los campos cultivables o como se presenta cuando se toman muestras mediante excavación para utilizarlas en el presente método de ensayo (14).

Mineralización: degradación completa de un compuesto orgánico a CO₂ y H₂O en condiciones aerobias y a CH₄, CO₂ y H₂O en condiciones anaerobias. En el contexto del presente método, cuando se utiliza un compuesto marcado con ¹⁴C, mineralización significa la amplia degradación durante la que se oxida un átomo de carbono marcado con liberación de la cantidad apropiada de ¹⁴CO₂ (14).

Semivida: t_{0,5}, es el tiempo que tarda la transformación del 50% de una sustancia de ensayo cuando puede describirse dicha transformación mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración.

DT₅₀ (Tiempo de desaparición 50): es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 50%; es distinto de la semivida t_{0,5} cuando la transformación no sigue una cinética de primer orden.

DT₇₅ (Tiempo de desaparición 75): es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 75%.

DT₉₀ (Tiempo de desaparición 90): es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 90%.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Deberán utilizarse sustancias de referencia para la caracterización y/o identificación de los productos de transformación por métodos espectroscópicos o cromatográficos.

1.4 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método es aplicable a todas las sustancias químicas (no marcadas o marcadas radiactivamente) para las que se dispone de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles, no volátiles, solubles en agua o insolubles en agua. El ensayo no deberá aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del suelo (p. ej., fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en el suelo en las condiciones experimentales del presente ensayo.

1.5 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la tasa de transformación podrá utilizarse una sustancia de ensayo marcada o no marcada. Para estudiar la vía de transformación y establecer un balance de materia se requiere material marcado. Se recomienda el marcado con ^{14}C , pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como ^{13}C , ^{15}N , ^3H o ^{32}P . El marcador deberá ubicarse, en la medida de lo posible, en la parte o las partes más estables de la molécula¹. La pureza de la sustancia de ensayo deberá ser de al menos el 95%.

Antes de realizar un ensayo sobre la transformación aerobia o anaerobia en el suelo, deberá contarse con la siguiente información relativa a la sustancia de ensayo.

- solubilidad en agua (Método A.6);
- solubilidad en disolventes orgánicos;
- presión de vapor (Método A.4) y constante de la ley de Henry;
- coeficiente de reparto n-octanol/agua (Método A.8);
- estabilidad química en la oscuridad (hidrólisis) (Método C.7);
- pK_a si una molécula es susceptible de protonación o desprotonación [Directriz 112 de la OCDE] (16).

También pueden resultar de utilidad los datos sobre la toxicidad de la sustancia de ensayo para los microorganismos del suelo [Métodos de ensayo C.21 y C.22] (16).

Deberá contarse con métodos analíticos (incluidos métodos de extracción y depuración) para la cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación.

1.6 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se tratan las muestras de suelo con la sustancia de ensayo y se incuban en la oscuridad en un matraz biométrico o en sistemas de flujo en condiciones de laboratorio controladas (a humedad del suelo y temperatura constantes). A intervalos de tiempo adecuados, se extraen muestras del suelo y se analizan en ellas la sustancia original y los productos de transformación. También se recogen los productos volátiles para su análisis con los dispositivos de absorción adecuados. Utilizando material marcado con ^{14}C es posible medir las diversas tasas de mineralización de la sustancia de ensayo atrapando el $^{14}\text{CO}_2$ resultante y establecer un balance de materia, incluyendo la formación de residuos ligados al suelo.

1.7 CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1 Recuperación

La extracción y el análisis de muestras de suelo cuando menos duplicadas inmediatamente después de la adición de la sustancia de ensayo dan una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia de ensayo. Los valores de recuperación para fases posteriores del experimento los dan los balances máxicos respectivos. Dichos valores deberán situarse entre el 90% y el 110% para sustancias químicas marcadas (8) y entre el 70% y el 110% para sustancias químicas no marcadas (3).

1.7.2 Repetibilidad y sensibilidad del método analítico

La repetibilidad del método analítico (excluida la eficiencia de extracción inicial) para cuantificar la sustancia de ensayo y los productos de transformación puede comprobarse realizando un análisis por duplicado del mismo extracto de suelo incubado durante tiempo suficiente para que se formen productos de transformación.

El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia de ensayo y de los productos de transformación deberá alcanzar, como mínimo, el menor de los siguientes valores: 0,01 mg·kg⁻¹ de suelo (como sustancia de ensayo) o un 1% de la dosis aplicada. También deberá especificarse el límite de cuantificación (LOQ).

1.7.3 Exactitud de los datos de transformación

El análisis de regresión de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo facilita la información apropiada sobre la fiabilidad de la curva de transformación y permite calcular los límites de confianza de las semividas (en el caso de la cinética de pseudo primer orden) o los valores DT₅₀ y, si procede, DT₇₅ y DT₉₀.

¹ Por ejemplo, si la sustancia de ensayo contiene un anillo, es preciso marcar ese anillo; si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de transformación.

1.8 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.8.1 Equipos y reactivos químicos

Los sistemas de incubación consisten en sistemas cerrados estáticos o sistemas de flujo adecuados (7) (17). En las figuras 1 y 2 se muestran ejemplos de, respectivamente, aparatos de flujo de incubación de suelo y matraces biométricos adecuados. Los dos tipos de sistema de incubación tienen sus ventajas y sus limitaciones (7) (17).

Se precisa el equipo estándar de laboratorio y, en particular:

- instrumentos analíticos tales como equipos GLC, HPLC, TLC, incluidos los sistemas de detección adecuados para el análisis de sustancias marcadas o no marcadas o el método de dilución isotópica inversa;
- instrumentos de identificación (p. ej., MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, etc.);
- contador de centelleo de líquidos;
- cámara de combustión oxidante de material radiactivo;
- centrifugadora;
- aparato de extracción (p. ej., tubos de centrifugación para extracción en frío y aparato Soxhlet para extracción continua a reflujo);
- instrumental para concentrar soluciones y extractos (p. ej., evaporador rotatorio);
- baño maría;
- dispositivo mezclador mecánico (p. ej., amasadora, mezcladora rotatoria).

Entre los reactivos químicos figuran, por ejemplo:

- NaOH, pureza de grado analítico, $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, u otra base apropiada (p. ej., KOH, etanolamina);
- H_2SO_4 , pureza de grado analítico, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$;
- glicol etileno, pureza de grado analítico;
- materiales sólidos de absorción, tales como cal sodada y piezas de poliuretano;
- disolventes orgánicos, pureza de grado analítico, tales como acetona, metanol, etc.;
- líquido de centelleo.

1.8.2 Aplicación de la sustancia de ensayo

Para incorporarla al suelo y distribuirla en él, podrá disolverse la sustancia de ensayo en agua (desionizada o destilada) o, si resulta necesario, en cantidades mínimas de acetona u otro disolvente orgánico (6) en el que la sustancia de ensayo sea suficientemente soluble y estable. No obstante, la cantidad de disolvente seleccionada no deberá tener una influencia significativa sobre la actividad microbiana del suelo (véanse apartados 1.5 y 1.9.2-1.9.3). Deberá evitarse el uso de disolventes inhibidores de la actividad microbiana, tales como cloroformo, diclorometano y otros disolventes halogenados.

Podrá incorporarse asimismo la sustancia de ensayo en forma sólida, p. ej., mezclada con arena de cuarzo (6) o en una pequeña submuestra del suelo sometido a ensayo que se haya secado al aire y esterilizado. Si se incorpora la sustancia de ensayo utilizando un disolvente, deberá permitirse que éste se evapore antes de incorporar la submuestra a la muestra de suelo original no estéril.

Para las sustancias químicas ordinarias, cuya principal vía de entrada en el suelo es a través de los lodos de depuración o la actividad agraria, deberá incorporarse primero la sustancia de ensayo al lodo, que luego se introducirá en la muestra de suelo. (véanse apartados 1.9.2 y 1.9.3).

No se recomienda la utilización rutinaria de productos formulados. No obstante, su utilización podría constituir una alternativa apropiada p. ej. en el caso de sustancias de ensayo poco solubles.

1.8.3 Suelos

1.8.3.1 Selección de suelos

Para determinar la vía de transformación, podrá utilizarse un suelo representativo; se recomienda un suelo franco arenoso o franco limoso o franco arenoso franco [según la clasificación de FAO y USDA (18)] con un pH de 5,5-8,0, un contenido de carbono orgánico de 0,5-2,5% y una biomasa microbiana de al menos 1% del carbono orgánico total (10).

Para estudios de tasa de transformación deberán utilizarse al menos tres suelos adicionales representativos de la gama de suelos relevante. Estos suelos deben variar en cuanto a contenido de carbono orgánico, pH, contenido de arcilla y biomasa microbiana (10).

Deberán caracterizarse todos los suelos, cuando menos, en cuanto a textura (% arena, % limo, % arcilla) [según la clasificación de FAO y USDA (18)], pH, capacidad de intercambio de cationes, carbono orgánico, densidad aparente, característica de retención de agua² y biomasa microbiana (solo para estudios aerobios). Cualquier otra información sobre las propiedades del suelo podría resultar de utilidad para la interpretación de los resultados. Para la determinación de las características del suelo, podrán utilizarse los métodos recomendados en las referencias (19)(20)(21)(22)(23). La biomasa microbiana se determinará utilizando el método de respiración inducida por el sustrato (SIR) (25)(26) o un método alternativo (20).

²

La característica de retención de agua de un suelo puede medirse como capacidad de campo, como capacidad de retención de agua o como tensión de succión de agua (pF). Más explicaciones en el anexo 1. Deberá consignarse en el informe del ensayo si las características de retención de agua y la densidad aparente de los suelos se determinaron en muestras no perturbadas o en muestras perturbadas (procesadas).

1.8.3.2 *Recogida, manipulación y conservación de suelos*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del lugar donde se haya recogido el suelo de ensayo. En particular, localización precisa, cubierta vegetal, tratamientos con sustancias químicas, tratamientos con abonos orgánicos e inorgánicos, adición de materiales biológicos u otro tipo de contaminación. No deberán utilizarse para estudios sobre transformación suelos que hayan sido tratados con la sustancia de ensayo o un análogo estructural de la misma dentro de los cuatro años precedentes (10)(15).

La muestra deberá haber sido recogida recientemente (del horizonte A o capa superior de 20 cm) y su contenido en agua deberá facilitar su tamizado. Salvo en el caso de los suelos de arrozales paddy, deberá evitarse la toma de muestras durante o inmediatamente después de un largo período (> 30 días) de sequía, helada o inundación (14). Las muestras deberán transportarse de manera que el contenido en agua del suelo varíe lo menos posible y mantenerse en la oscuridad y ventiladas en la mayor medida posible. Suele estar indicado el uso de una bolsa de polietileno sin cerrar completamente.

Una vez tomada la muestra, deberá procesarse el suelo lo antes posible. Deberá retirarse la vegetación, la fauna edáfica de mayor tamaño y las piedras antes de hacer pasar el suelo por un tamiz de 2 mm que permita retirar los restos de vegetales y animales y pequeñas piedras. Se procurará evitar el secado y aplastamiento excesivos del suelo antes del tamizado (15).

Cuando resulte difícil tomar muestras en invierno (por hallarse el suelo helado o cubierto por una capa de nieve), podrá extraerse de un lote de suelo almacenado en el invernadero bajo cubierta vegetal (p. ej., hierba o mezcla de hierba y trébol). Pese a preferirse claramente los estudios con suelos recién recogidos del campo, si es preciso almacenar el suelo recogido y procesado antes de comenzar el estudio, las condiciones de conservación deberán ser las adecuadas y el plazo de almacenamiento limitado ($4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un máximo de tres meses) para mantener la actividad microbiana³. Se encontrarán instrucciones detalladas sobre la recogida, manipulación y conservación de suelos con vistas a su uso en experimentos de biotransformación en (8)(10)(15)(26)(27).

Antes de utilizar en este ensayo el suelo procesado, deberá preincubarse éste para hacer posible la germinación y eliminación de las semillas y restablecer el equilibrio del metabolismo microbiano tras el paso de las condiciones de muestreo o conservación a las de incubación. En general resulta adecuado un período de preincubación de entre 2 y 28 días en condiciones de temperatura y humedad próximas a las del ensayo real (15). La suma de los períodos de conservación y de preincubación no deberá exceder de tres meses.

1.9 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.9.1 **Condiciones de ensayo**

1.9.1.1 *Temperatura del ensayo*

Durante la totalidad del período de ensayo, deberán incubarse los suelos en la oscuridad a una temperatura constante que sea representativa de las condiciones climáticas en que tendrá lugar el uso o la liberación. Se recomienda una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ para todas las sustancias de ensayo que puedan llegar al suelo en climas templados. Deberá controlarse esta temperatura.

Si se trata de sustancias químicas aplicadas o liberadas en climas más fríos (p. ej., en países septentrionales, durante el otoño o el invierno), deberán incubarse muestras de suelo adicionales pero a una temperatura inferior (p. ej., $10 \pm 2^\circ\text{C}$).

1.9.1.2 *Contenido de humedad*

Para los ensayos de transformación en condiciones aerobias, deberá ajustarse el contenido de humedad⁴ del suelo a un pF situado entre 2,0 y 2,5 y mantenerse en ese valor (3) El contenido de humedad del suelo se expresa como cociente entre masa de agua y masa de suelo seco y debe ser controlado periódicamente (p. ej., a intervalos de 2 semanas) pesando los recipientes de incubación y compensando las pérdidas de agua mediante la adición de, preferiblemente, agua de grifo esterilizada por filtración. Habrá que procurar evitar o reducir al mínimo las pérdidas de sustancia de ensayo y/o productos de transformación por volatilización y/o fotodegradación (en su caso) durante la adición de humedad.

Para los ensayos de transformación en condiciones anaerobias y de arrozal, se satura de agua el suelo mediante inundación.

1.9.1.3 *Condiciones aerobias de incubación*

En los sistemas de flujo, se mantendrán las condiciones aerobias mediante baldeo intermitente o ventilación continua con aire húmedo. En los matraces biométricos, se mantendrá el intercambio de aire mediante difusión.

1.9.1.4 *Condiciones aerobias estériles*

Con el fin de obtener información sobre la importancia de la transformación abiótica de una sustancia de ensayo, las muestras de suelo podrán ser esterilizadas (sobre métodos de esterilización, véanse referencias 16 y 29), tratadas con una sustancia de ensayo estéril (p. ej., adición de solución a través de un filtro estéril) y aireadas con aire humidificado estéril según se describe en el apartado 1.9.1.3. En el caso de los suelos de arrozal, será preciso esterilizar el suelo y el agua, y efectuar la incubación según se describe en el apartado 1.9.1.6.

³ Según los resultados de recientes investigaciones, los suelos de las zonas templadas pueden almacenarse también a -20°C durante más de tres meses (28) (29) sin pérdida significativa de actividad microbiana.

⁴ El suelo no deberá estar ni demasiado húmedo ni demasiado seco para mantener una aireación y nutrición adecuadas de la microflora edáfica. El contenido de humedad recomendado para un crecimiento microbiano óptimo se sitúa entre 40-60% de capacidad de retención de agua (WHC) y entre 0,1-0,33 bar (6). Este último intervalo equivale a un pF comprendido entre 2,0 y 2,5. En el anexo 2 se dan los contenidos de humedad típicos de varios tipos de suelo.

1.9.1.5 *Condiciones anaerobias de incubación*

Para crear y mantener unas condiciones anaerobias, se procede a cubrir de agua (capa de 1-3 cm de agua) el suelo previamente tratado con la sustancia de ensayo e incubado en condiciones aerobias durante 30 días o una semivida o DT_{50} (el valor que sea más pequeño) y a inyectar un gas inerte (p. ej. nitrógeno o argón) en el sistema de incubación⁵. El sistema de ensayo deberá permitir la medición del pH, la concentración de oxígeno y el potencial redox e incluir dispositivos de fijación de productos volátiles. El sistema biométrico deberá estar cerrado, para evitar la entrada de aire por difusión.

1.9.1.6 *Condiciones de incubación de arrozal*

Para estudiar la transformación en suelos de arrozal, se inundará el suelo con una capa de agua de 1 - 5 cm y se aplica la sustancia de ensayo a la fase acuosa (9). Se recomienda que la profundidad del suelo sea de al menos 5 cm. El sistema se ventila con aire como en condiciones aerobias. Deberán controlarse y registrarse el pH, la concentración de oxígeno y el potencial redox de la capa acuosa. Será necesario un período de preincubación de al menos dos semanas antes de dar comienzo a los estudios de transformación (véase apartado 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Duración del ensayo*

Los estudios de tasa y vía no deberán exceder normalmente de 120 días⁶ (3)(6)(8), porque transcurrido ese plazo es de esperar un decrecimiento de la actividad microbiana del suelo con el tiempo en un sistema artificial de laboratorio sin posibilidad de reconstitución natural. Cuando resulte necesario para caracterizar el declive de la sustancia de ensayo y la formación y declive de los principales productos de transformación, podrán prolongarse los estudios durante períodos más largos (p. ej., 6 o 12 meses) (8). El uso de un período de incubación más largo deberá quedar justificado en el informe del ensayo y acompañarse de medidas de biomasa durante y al final del período.

1.9.2 **Realización del ensayo**

Se colocan de 50 a 200 g de suelo (peso seco) en cada recipiente de incubación (véanse figuras 1 y 2 del anexo 3) y se trata el suelo con la sustancia de ensayo mediante uno de los métodos descritos en el apartado 1.8.2. Cuando se utilicen disolventes orgánicos para la aplicación de la sustancia de ensayo, deberán retirarse del suelo por evaporación. A continuación, se mezcla bien el suelo con una espátula y/o agitando el recipiente. Si el estudio se realiza en condiciones de arrozal, se mezclarán bien el suelo y el agua tras la aplicación de la sustancia de ensayo. Se analizarán pequeñas partes alícuotas (p. ej., 1 g) de los suelos tratados para comprobar la distribución uniforme de la sustancia de ensayo. Más adelante se presentan métodos alternativos.

La tasa de tratamiento debe corresponder a la tasa de aplicación más elevada de un producto fitosanitario recomendada en las instrucciones de empleo y a incorporación uniforme a una profundidad apropiada en el campo (p. ej., capa superior⁷ de 10 cm de suelo). Por ejemplo, para productos químicos aplicados sobre el follaje o el suelo sin incorporación, la profundidad apropiada para calcular la cantidad de producto químico que debe añadirse a cada recipiente es de 2,5 cm. Para productos químicos incorporados al suelo, la profundidad apropiada es la profundidad de incorporación especificada en las instrucciones de empleo. Para productos químicos ordinarios, deberá calcularse la tasa de aplicación sobre la base de la vía de penetración más importante; por ejemplo, cuando la vía principal de penetración en el suelo sean los lodos de depuración, deberá dosificarse el producto químico en el lodo a una concentración que corresponda a la concentración prevista en el lodo y deberá añadirse al suelo una cantidad de lodo que corresponda a su carga normal en los suelos agrícolas. Si esta concentración no es suficientemente elevada para permitir la identificación de los principales productos de transformación, podrá proceder la incubación de muestras de suelo independientes que contengan tasas superiores, pero deben evitarse las tasas excesivas que influyan en las funciones microbianas del suelo (véanse apartados 1.5 y 1.8.2).

Alternativamente, se podrá tratar un lote de suelo mayor (de 1 a 2 kg) con la sustancia de ensayo, mezclándolo bien en una máquina mezcladora adecuada y transfiriéndolo luego en porciones pequeñas de 50 a 200 g a los recipientes de incubación (por ejemplo utilizando separadores de muestras). Se analizarán pequeñas partes alícuotas (p. ej., 1 g) del lote de suelo tratado para comprobar la distribución uniforme de la sustancia de ensayo. Resulta preferible este procedimiento porque hace posible una distribución más uniforme de la sustancia de ensayo en el suelo.

Por otra parte, se incuban muestras de suelo no tratadas en las mismas condiciones (aerobias) de las muestras tratadas con la sustancia de ensayo. Estas muestras se utilizan para medición de biomasa durante los estudios y al finalizar éstos.

Cuando se aplica al suelo la sustancia de ensayo disuelta en uno o más disolventes orgánicos, se incuban muestras de suelo tratadas con la misma cantidad de disolvente(s) en las mismas condiciones (aerobias) que las muestras tratadas con la sustancia de ensayo. Estas muestras se utilizan para medir la biomasa al comienzo, durante y al final de los estudios, con el fin de comprobar los efectos del disolvente o los disolventes en la biomasa microbiana.

⁵ Las condiciones aerobias son dominantes en los suelos superficiales e incluso en los situados debajo de la superficie, según demuestra un proyecto de investigación patrocinado por la UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Las condiciones anaerobias se presentan tan solo ocasionalmente con motivo de la inundación del suelo tras lluvias intensas o cuando se establecen las condiciones de arrozal.

⁶ Los estudios aerobios podrían terminar mucho antes de estos 120 días siempre que se haya establecido manifiestamente la vía de transformación última y la mineralización última. Es posible asimismo la terminación del ensayo a los 120 días, o cuando se haya transformado el 90% de la sustancia de ensayo, pero sólo si se ha formado al menos un 5% de CO_2 .

⁷ La concentración inicial en una superficie se calcula utilizando la ecuación siguiente:

$$C_{\text{soil}}[\text{mg}/\text{kg}_{\text{soil}}] = \frac{A[\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^6[\text{mg}/\text{kg}]}{l[\text{m}] \cdot 10^4[\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d[\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

C_{soil} = concentración inicial en el suelo [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

A = tasa de aplicación [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = espesor de la capa de suelo en el campo [m]; d = densidad aparente en seco del suelo [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$].

A título indicativo, una tasa de aplicación de $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ da por resultado una concentración en el suelo de aproximadamente $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ en una capa de 10 cm (supuesta una densidad aparente de $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Los recipientes con el suelo tratado serán conectados al sistema de flujo descrito en la figura 1 o cerrados con la columna de absorción mostrada en la figura 2 (véase el anexo 3).

1.9.3 Muestreo y medidas

Se retirarán los recipientes de incubación duplicados a intervalos de tiempo apropiados, extrayéndose muestras de suelo con disolventes adecuados de distinta polaridad y analizándose para medir la sustancia de ensayo y/o los productos de transformación. Un estudio bien diseñado deberá incluir recipientes suficientes, de manera que puedan sacrificarse dos en cada toma de muestras. De la misma manera, se retirarán soluciones de absorción o materiales sólidos de absorción a distintos intervalos temporales (de 7 días durante el primer mes y de 17 días posteriormente) durante y al final de la incubación de cada muestra de suelo y se analizan para medir productos volátiles. Además de la muestra de suelo tomada directamente tras la aplicación (muestra del día cero), deberán incluirse al menos 5 puntos de muestreo adicionales. Se escogerán los intervalos de tiempo de manera que se pueda determinar el patrón de declive de la sustancia de ensayo y los patrones de formación y declive de los productos de transformación (p. ej., 0, 1, 3, 7 días; 2, 3 semanas; 1, 2, 3 meses, etc.).

Cuando se use una sustancia de ensayo marcada con ^{14}C , se cuantificará la radiactividad no extraíble mediante combustión y se calculará un balance de materia para cada intervalo de muestreo.

En caso de incubación anaerobia o de arrozal, se podrán analizar conjuntamente las fases de suelo y agua para medir la sustancia de ensayo y los productos de transformación, o separarlas por filtración o centrifugado antes de la extracción y el análisis.

1.9.4 Ensayos facultativos

Podría resultar de utilidad la realización de estudios aerobios no estériles para otros valores de temperatura y humedad del suelo para estimar la influencia de la temperatura y la humedad del suelo sobre la tasa de transformación de una sustancia de ensayo y/o de sus productos de transformación en el suelo.

Puede intentarse otra caracterización de la radiactividad no extraíble utilizando, por ejemplo, extracción mediante fluido supercrítico.

2 RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Las cantidades de sustancia de ensayo, productos de transformación, sustancias volátiles (solo en porcentaje) y no extraíbles se expresarán en porcentaje de la concentración inicial aplicada y, cuando proceda, en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de suelo (sobre la base del peso del suelo en seco) para cada intervalo de muestreo. El balance de materia se expresará en porcentaje de la concentración inicial aplicada para cada intervalo de muestreo. La representación gráfica de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo permitirá estimar la semivida de su transformación o DT_{50} . Deberán identificarse los principales productos de transformación y se representarán gráficamente sus concentraciones en función del tiempo para mostrar sus tasas de formación y declive. Se considerará producto de transformación principal cualquier producto que represente $\geq 10\%$ de la dosis aplicada en cualquier momento del estudio.

Los productos volátiles fijados dan una indicación de la volatilidad potencial de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación a partir del suelo.

Se obtendrán determinaciones más exactas de las semividas o valores DT_{50} y, si procede, valores DT_{75} y DT_{90} , mediante cálculos con los modelos cinéticos apropiados. Se consignarán los valores de semivida y DT_{50} junto con la descripción del modelo utilizado, el orden de la cinética y el coeficiente de determinación (r^2). Se prefiere la cinética de primer orden salvo que $r^2 < 0,7$. Si procede, se aplicarán los cálculos asimismo a los principales productos de transformación. En las referencias 31 a 35 se describen ejemplos de modelos adecuados.

Si se trata de estudios de tasas efectuados a varias temperaturas, las tasas de transformación deberán describirse como función de la temperatura dentro del intervalo de temperaturas experimental utilizando la relación de Arrhenius de la forma:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \quad \text{o} \quad \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

donde $\ln A$ y B son constantes de regresión que corresponden a la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente, de una recta de mejor ajuste generada por regresión lineal de $\ln k$ frente a $1/T$, k es la constante de tasa a temperatura T y T es la temperatura en Kelvin. Deberá prestarse atención al intervalo limitado de temperaturas en el que será válida la relación de Arrhenius en el caso de que la transformación esté gobernada por la acción microbiana.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Aunque los estudios se realizan en un sistema artificial de laboratorio, los resultados permitirán estimar la tasa de transformación de la sustancia de ensayo e igualmente la tasa de formación y declive de los productos de transformación en condiciones de campo (36)(37).

El estudio de la vía de transformación de una sustancia de ensayo aporta información sobre la transformación estructural de la sustancia aplicada en el suelo por reacciones químicas y microbianas.

3 INFORME**INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

- nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la(s) posición(es) del marcador(es) cuando se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase apartado 1.5);
- pureza (impurezas) de la sustancia de ensayo;
- pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad específica (si procede);

Sustancias de referencia:

- nombre químico y estructura de las sustancias de referencia utilizadas para caracterizar y/o identificar los productos de transformación;

Suelos de ensayo:

- detalles del lugar donde se recogieron;
- fecha y procedimiento de muestreo;
- propiedades de los suelos, tales como pH, contenido de carbono orgánico, textura (% arena, % limo, % arcilla), capacidad de intercambio de cationes, densidad aparente, característica de retención de agua y biomasa microbiana
- duración del almacenamiento y condiciones de conservación (si se ha almacenado);

Condiciones de ensayo:

- fechas de realización de los estudios;
- cantidad de la sustancia de ensayo aplicada;
- disolventes utilizados y método de aplicación de la sustancia de ensayo;
- peso del suelo tratado inicialmente y muestreado a cada intervalo para su análisis;
- descripción del sistema de incubación utilizado;
- tasas de flujo de aire (solo para sistemas de flujo);
- temperatura de la configuración experimental;
- contenido de humedad del suelo durante la incubación;
- biomasa microbiana al comienzo, durante y al final de los estudios aerobios;
- pH, concentración de oxígeno y potencial redox al comienzo, durante y al final de los estudios anaerobios y de arrozal;
- método(s) de extracción;
- métodos de cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de los principales productos de transformación en el suelo y los materiales de absorción;
- número de duplicados y número de controles.

Resultados:

- resultado de la determinación de la actividad microbiana;
- repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados;
- tasas de recuperación (en el apartado 1.7.1 se dan los valores porcentuales para un estudio válido);
- cuadros de resultados expresados como porcentaje de la dosis inicial aplicada y, si procede, en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de suelo (sobre la base del peso en seco);
- balance de materia durante y al final de los estudios;
- caracterización de la radiactividad no extraíble (ligada) o los residuos en el suelo;
- cuantificación del CO_2 y otros compuestos volátiles liberados;
- representación gráfica de concentración en el suelo en función del tiempo de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación;
- semivida o DT_{50} , DT_{75} y DT_{90} de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación, incluyendo límites de confianza;
- estimación de la tasa de degradación abiótica en condiciones estériles;
- valoración de la cinética de transformación de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación;
- vías de transformación propuestas, si procede;
- evaluación e interpretación de los resultados;
- datos en bruto (muestras de cromatogramas, muestras de cálculos de tasas de transformación y medios utilizados para identificar los productos de transformación).

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Unión Europea (UE) (1995). Directiva 95/36/CE de la Comisión, de 14 de julio de 1995, por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Anexo II, parte A y anexo III, parte A: Destino y comportamiento en el medio ambiente.

- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil - Part 1 : Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF - Japan 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)
- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Anexo V de la Dir. 67/548/CEE.
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallyl im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.
- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 39, 188-204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 33, 47-60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.
- (37) Hurler K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

ANEXO 1

TENSIÓN DE AGUA, CAPACIDAD DE CAMPO (FC) Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (WHC)(1)

| Altura de la columna de agua [cm] | pF ^(a) | bar ^(b) | Observaciones |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 10 ⁷ | 7 | 10 ⁴ | Suelo seco |
| 1,6 · 10 ⁴ | 4,2 | 16 | Punto de marchitamiento |
| 10 ⁴ | 4 | 10 | |
| 10 ³ | 3 | 1 | |
| 6 · 10 ² | 2,8 | 0,6 | |
| 3,3 · 10 ² | 2,5 | 0,33 ^(c) | |
| 10 ² | 2 | 0,1 | Gama de |
| 60 | 1,8 | 0,06 | Capacidad de campo ^(d) |
| 33 | 1,5 | 0,033 | |
| 10 | 1 | 0,01 | WHC (aproximación) |
| 1 | 0 | 0,001 | Suelo saturado de agua |

(a) pF = log de la altura en cm de la columna de agua.

(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

(c) Corresponde a un contenido de agua aproximado de 10% en arena, 35% en suelo franco y 45% en arcilla.

(d) La capacidad de campo no es constante, sino que varía con el tipo de suelo entre pF 1,5 y 2,5.

La *tensión de agua* se mide en cm de columna de agua o en bar. Dada la amplia gama de valores posibles, la tensión de succión se expresa sencillamente como el valor pF equivalente al logaritmo de la altura en cm de la columna de agua.

La *capacidad de campo* se define como la cantidad de agua que puede almacenar un suelo natural contra la gravedad 2 días después de un largo período de lluvia o tras una irrigación suficiente. Se determina sobre el terreno en un suelo no perturbado. Por ello, la medida no es aplicable a muestras de suelo de laboratorio perturbadas. Los valores de FC determinados en suelos perturbados pueden mostrar grandes varianzas sistemáticas.

La *capacidad de retención de agua* (WHC) se determina en el laboratorio con suelo perturbado y no perturbado mediante saturación con agua de una columna de suelo por transporte capilar. Resulta especialmente útil para suelos perturbados y puede ser hasta un 30% superior a la capacidad de campo (1). Además, experimentalmente es más fácil determinar la WHC que valores de FC fiables.

(1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

ANEXO 2

CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO (g de agua por 100 g de suelo seco) DE VARIOS TIPOS DE SUELO DE DIVERSOS PAÍSES

| Tipo de suelo | País | Contenido de humedad del suelo a | | |
|------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------|
| | | WHC ¹ | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Arena | Alemania | 28,7 | 8,8 | 3,9 |
| Suelo arenoso franco | Alemania | 50,4 | 17,9 | 12,1 |
| Suelo arenoso franco | Suiza | 44,0 | 35,3 | 9,2 |
| Suelo franco limoso | Suiza | 72,8 | 56,6 | 28,4 |
| Suelo franco arcilloso | Brasil | 69,7 | 38,4 | 27,3 |
| Suelo franco arcilloso | Japón | 74,4 | 57,8 | 31,4 |
| Suelo franco arenoso | Japón | 82,4 | 59,2 | 36,0 |
| Suelo franco limoso | EE. UU. | 47,2 | 33,2 | 18,8 |
| Suelo franco arenoso | EE. UU. | 40,4 | 25,2 | 13,3 |

¹ Capacidad de retención de agua

ANEXO 3

Figura 1

Ejemplo de aparato de flujo para estudiar la transformación de las sustancias químicas en el suelo (1)(2)

- | | | |
|--|---|--|
| 1: válvula de aguja | 4: frasco de metabolismo del suelo (encharcado solo para condiciones anaerobias o de arrozal) | 7, 8: fijador de hidróxido de sodio para CO ₂ y compuestos ácidos volátiles |
| 2: lavador de gas que contiene agua | 5: fijador de glicol etileno para compuestos orgánicos volátiles | 9: caudalímetro |
| 3: ultramembrana (solo en condiciones estériles), tamaño de poro de 0,2 μm | 6: fijador de ácido sulfúrico para compuestos alcalinos volátiles | |

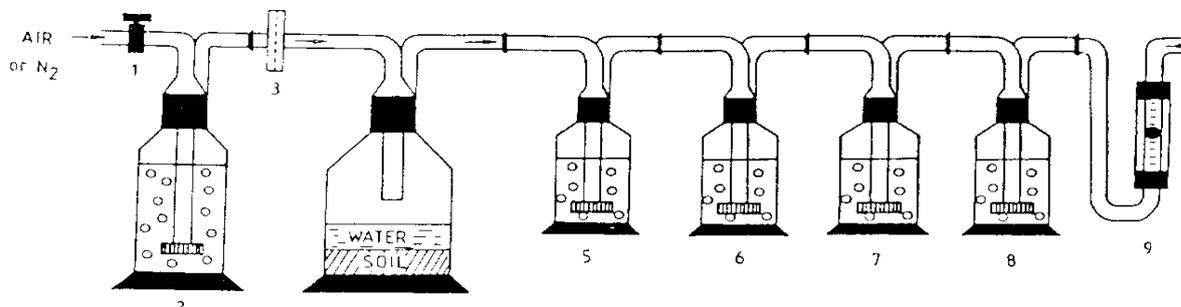
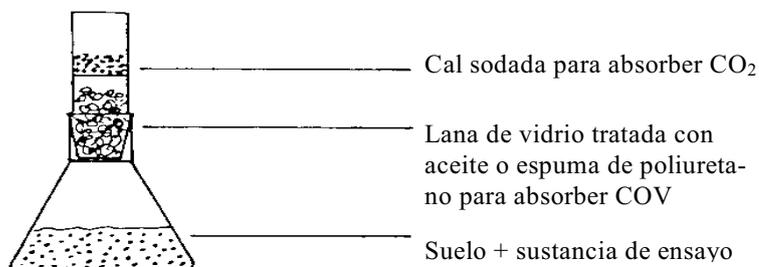


Figura 2

Ejemplo de matraz biométrico para el estudio de la transformación de las sustancias químicas en el suelo (3)



- Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In *Interactions between Herbicides and the Soil* (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141-146.

C.24. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN SISTEMAS DE SEDIMENTOS ACUÁTICOS**1. MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 308 (2002).

1.1 INTRODUCCIÓN

Los productos químicos pueden llegar a las aguas superficiales a nivel profundo o poco profundo por vías como la aplicación directa, los aerosoles erráticos, la escorrentía, la eliminación de residuos, los efluentes domésticos o agrícolas y la deposición atmosférica. Este método de ensayo consiste en un método de laboratorio para evaluar la transformación aerobia y anaerobia de las sustancias químicas orgánicas en los sistemas de sedimentos acuáticos. El método se basa en directrices ya existentes (1)(2)(3)(4)(5)(6). En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (7) se alcanzó un acuerdo, en particular, sobre el número y tipos de sedimentos que deben utilizarse en este ensayo. Dicho seminario formuló asimismo recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de sedimentos, basadas en la Directriz ISO correspondiente (8). Estos estudios son necesarios para las sustancias químicas que se apliquen directamente al agua o que tengan probabilidades de llegar al medio ambiente acuático por las vías mencionadas anteriormente.

Las condiciones en los sistemas de sedimentos acuáticos naturales son a menudo aerobias en la fase acuosa superior. La capa superficial del sedimento puede ser o bien aerobia o bien anaerobia, mientras que el sedimento más profundo normalmente es anaerobio. Para abarcar todas estas posibilidades, en el presente documento se describen tanto ensayos aerobios como anaerobios. El ensayo aerobio simula una columna de agua aerobia sobre una capa de sedimento aerobio a la que subyace una gradiente anaerobio. El ensayo anaerobio simula un sistema de sedimento acuático completamente anaerobio. Si las circunstancias indican que es necesario desviarse significativamente de estas recomendaciones, por ejemplo utilizando núcleos de sedimentos intactos o sedimentos que haya estado expuestos a las sustancia de ensayo, se dispone de otros métodos con este fin (9).

1.2 DEFINICIONES

En cualquier caso deben utilizarse unidades internacionales (Standard International (SI) units).

Sustancia de ensayo: cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

Productos de transformación: todas las sustancias resultantes de las reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia de ensayo, incluido el CO₂ y los residuos ligados.

Residuos ligados: compuestos del suelo, la planta o el animal que persisten en la matriz en forma de sustancia original o de sus productos de transformación/metabolitos tras la extracción. El método de extracción no debe modificar sustancialmente ni los propios compuestos ni la estructura de la matriz. La naturaleza del vínculo puede aclararse parcialmente mediante métodos de extracción que alteren la matriz y técnicas analíticas sofisticadas. Así por ejemplo, hasta la fecha se han identificado de esta manera enlaces covalentes, iónicos y de sorción, así como atrapamientos. En general, la formación de residuos ligados reduce de manera significativa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (10) [modificado de IUPAC 1984 (11)].

Transformación aerobia: (oxidación) reacciones que se producen en presencia de oxígeno molecular (12).

Transformación anaerobia: (reducción) reacciones que se producen en ausencia de oxígeno molecular (12).

Aguas naturales: aguas superficiales obtenidas de estanques, ríos, arroyos, etc.

Sedimento: mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado. El sedimento es depositado por las aguas naturales y forma una interfaz con el agua.

Mineralización: degradación completa de un compuesto orgánico a CO₂ y H₂O en condiciones aerobias y a CH₄, CO₂ y H₂O en condiciones anaerobias. En el contexto del presente método, cuando se utiliza un compuesto radiomarcado, mineralización significa la amplia degradación de una molécula durante la cual se oxida un átomo de carbono marcado o se reduce cuantitativamente con liberación de la cantidad apropiada de ¹⁴CO₂ o ¹⁴CH₄, respectivamente.

Semivida: t_{0,5}, es el tiempo que tarda la transformación del 50% de una sustancia de ensayo cuando puede describirse dicha transformación mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración inicial.

DT₅₀ (Tiempo de desaparición 50): es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 50%.

DT₇₅ (Tiempo de desaparición 75): es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 75%.

DT₉₀ (Tiempo de desaparición 90): es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 90%.

1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Deben utilizarse sustancias de referencia para la cuantificación e identificación de los productos de transformación por métodos espectroscópicos o cromatográficos.

1.4 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la tasa de transformación podrá utilizarse una sustancia de ensayo no marcada o marcada con un isótopo, aunque se prefiere el material marcado. Para estudiar la vía de transformación y establecer un balance de materia se requiere material marcado. Se recomienda el marcado con ¹⁴C,

pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como ^{13}C , ^{15}N , ^3H o ^{32}P . El marcador deberá ubicarse, en la medida de lo posible, en la parte o las partes más estables de la molécula¹. La pureza química y/o radioquímica de la sustancia de ensayo debe ser de al menos el 95%.

Antes de llevar a cabo el ensayo, debe disponerse de la información siguiente sobre la sustancia de ensayo:

- a) solubilidad en agua (Método A.6)
- b) solubilidad en disolventes orgánicos;
- c) presión de vapor (Método A.4) y constante de la ley de Henry;
- d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (Método A.8);
- e) coeficiente de adsorción (K_d , K_f o K_{oc} , en su caso) (Método C.18);
- f) hidrólisis (Método C.7);
- g) constante de disociación ($\text{p}K_a$) [Directriz OECD 112] (13);
- h) estructura química de la sustancia de ensayo y posición de la marca o marcas isotópicas, en su caso.

Nota: debe indicarse la temperatura a la que se hicieron estas mediciones.

Además, puede incluirse otra información de utilidad como datos sobre la toxicidad de la sustancia de ensayo para los microorganismos, sobre la biodegradabilidad inherente o inmediata, y sobre la transformación aerobia y anaerobia en el suelo.

Debe contarse con métodos analíticos (incluidos métodos de extracción y depuración) para la cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación en el agua y los sedimentos (véase el apartado 1.7.2).

1.5 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El método descrito en este ensayo emplea un sistema de sedimento acuático aerobio y anaerobio (véase el anexo 1) que permite:

- (i) la medición de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo en un sistema de sedimento-agua,
- (ii) la medición de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo en el sedimento,
- (iii) la medición de la tasa de mineralización de la sustancia de ensayo y/o sus productos de transformación (cuando se utiliza una sustancia de ensayo marcada con ^{14}C),
- (iv) la identificación y cuantificación de los productos de transformación en las fases acuática y de sedimentaria incluido el balance de materia (cuando se utilice una sustancia de ensayo marcada),
- (v) la medición de la distribución de la sustancia de ensayo y sus productos de transformación entre las dos fases durante un período de incubación en la oscuridad (para evitar, por ejemplo, floraciones de algas) a temperatura constante; las semividas y los valores DT_{50} , DT_{75} y DT_{90} se determinarán cuando los datos lo permitan, pero no deben extrapolarse mucho más allá del período experimental (véase el apartado 1.2).

Se requieren al menos dos sedimentos y sus aguas asociadas para cada uno de los estudios aerobio y anaerobio (7). Sin embargo, puede haber casos en los que se usen más de dos sedimentos acuáticos, por ejemplo, para una sustancia química que pueda estar presente en entornos de aguas dulces y/o marinas.

1.6 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método es aplicable en general a todas las sustancias químicas (no marcadas o marcadas) para las que se disponga de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles, no volátiles, solubles en agua o poco solubles en agua. El ensayo no deberá aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del agua (p. ej., fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en el agua y/o el sedimento en las condiciones experimentales del presente ensayo.

Este método se ha aplicado hasta ahora para estudiar la transformación de sustancias químicas en aguas dulces y sedimentos, pero, en principio, se puede aplicar también a sistemas marinos/de estuarios. No es adecuado para simular las condiciones de aguas corrientes (por ejemplo, ríos) o el mar abierto.

1.7 CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1 Recuperación

La extracción y el análisis de muestras de agua y sedimento, cuando menos duplicadas, inmediatamente después de la adición de la sustancia de ensayo dan una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia de ensayo. Los valores de recuperación para fases posteriores del experimento los dan los balances de materia respectivos (cuando se utiliza material marcado). Dichos valores deben situarse entre el 90% y el 110% para sustancias químicas marcadas (6) y entre el 70% y el 110% para sustancias químicas no marcadas.

1.7.2 Repetibilidad y sensibilidad del método analítico

La repetibilidad del método analítico (excluida la eficiencia de extracción inicial) para cuantificar la sustancia de ensayo y los productos de transformación puede comprobarse realizando un análisis por duplicado del mismo extracto de las muestras de agua o sedimento que fueron incubadas durante tiempo suficiente para que se formaran productos de transformación.

¹ Por ejemplo, si la sustancia de ensayo contiene un anillo, es preciso marcar ese anillo: si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de transformación.

El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia de ensayo y de los productos de transformación debe alcanzar, como mínimo, el menor de los siguientes valores: 0,01 mg·kg⁻¹ de agua o sedimento (como sustancia de ensayo) o un 1% de la cantidad inicial aplicada a un sistema de ensayo. También debe especificarse el límite de cuantificación (LOQ).

1.7.3 Exactitud de los datos de transformación

El análisis de regresión de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo facilita la información apropiada sobre la fiabilidad de la curva de transformación y permite calcular los límites de confianza de las semividas (en el caso de la cinética de pseudo primer orden) o los valores DT₅₀ y, si procede, DT₇₅ y DT₉₀.

1.8 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.8.1 Sistema de ensayo y equipo

El estudio debe hacerse en recipientes de vidrio (por ejemplo, frascos, tubos de centrifugación), a menos que se disponga de información preliminar (como el coeficiente de reparto n-octanol/agua, datos sobre adsorción, etc.) que indiquen que la sustancia de ensayo puede adherirse al vidrio, en este caso tendrá que estudiarse la posibilidad de emplear un material alternativo (como Teflon). Cuando se sepa que la sustancia de ensayo se adhiere al vidrio, podrá paliarse el problema recurriendo a uno o varios de los métodos siguientes:

- determinar la masa de la sustancia de ensayo y los productos de transformación que adsorbe el vidrio,
- hacer un lavado con disolvente de todos los recipientes de vidrio al final del ensayo;
- utilizar productos formulados (véase también el apartado 1.9.2);
- utilizar una cantidad mayor de co-disolvente para añadir la sustancia de ensayo al sistema; si se emplea un co-disolvente debe tratarse de uno que no solvate la sustancia de ensayo.

En los anexos 2 y 3, respectivamente, se muestran ejemplos de aparatos de ensayo habituales, por ejemplo, sistemas de flujo de gas y biométricos (14). En la referencia 15 se describen otros sistemas útiles de incubación. El diseño del aparato experimental debe permitir el intercambio de aire o nitrógeno y la fijación de los productos volátiles. Las dimensiones del aparato deben ser tales que se cumplan los requisitos del ensayo (véase el apartado 1.9.1). Podrá ventilarse o bien mediante un burbujeo suave o bien haciendo pasar aire o nitrógeno sobre la superficie del agua. En este último caso puede ser aconsejable agitar suavemente el agua desde arriba para una mejor distribución del oxígeno o el nitrógeno en ésta. No debe usarse aire sin CO₂ ya que puede aumentar el pH del agua. En cualquiera de los dos casos, no es conveniente remover el sedimento, cosa que debe evitarse todo lo posible. Las sustancias químicas ligeramente volátiles deben ensayarse en sistema biométrico con una agitación suave de la superficie del agua. También pueden utilizarse recipientes cerrados con un espacio libre o bien de aire atmosférico o bien de nitrógeno y frascos internos para la fijación de productos volátiles (16). En el ensayo aerobio se requiere un intercambio regular del gas del espacio libre a fin de compensar el consumo de oxígeno de la biomasa.

Entre los fijadores adecuados para recoger productos de transformación volátiles cabe citar, de manera no exhaustiva, las soluciones 1 mol·dm⁻³ de hidróxido de potasio o hidróxido de sodio para el dióxido de carbono² y el etileno glicol, la etanolamina o la parafina al 2% en xileno para los compuestos orgánicos. Los compuestos volátiles formados en condiciones anaerobias, como el metano, pueden recogerse, por ejemplo, mediante tamices moleculares. Estos compuestos volátiles pueden convertirse, por ejemplo, en CO₂ por combustión haciendo pasar el gas por un tubo de cuarzo lleno de CuO a una temperatura de 900°C y captando el CO₂ formado en un absorbedor con una base (17).

Se requiere un equipo de laboratorio para el análisis químico de la sustancia de ensayo y los productos de transformación (por ejemplo, cromatografía líquida de gases (GLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), espectroscopía de masas (MS), cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS), espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN), etc.), incluidos sistemas de detección para sustancias químicas radiomarcadas o no radiomarcadas, según corresponda. Cuando se utilice material radiomarcado se necesitará también un contador de centelleo de líquidos y una cámara de combustión oxidante (para la combustión de muestras de sedimento antes del análisis de radiactividad).

Además se necesitará, según corresponda, otro equipo de laboratorio estándar para análisis fisicoquímicos y biológicos (véase el cuadro 1, apartado 1.8.2.2), así como recipientes de vidrio, sustancias químicas y reactivos.

1.8.2 Selección y número de sedimentos acuáticos

Los lugares donde se tomen las muestras deberán seleccionarse con arreglo a la finalidad del ensayo en cualquier situación dada. Al seleccionar los lugares donde se tomen las muestras, se tendrá en cuenta su historia en cuanto a posibles aportaciones de origen agrícola, industrial o doméstico a la cuenca o los ríos o arroyos aguas arriba. No deben usarse sedimentos si han sido contaminados con la sustancia de ensayo o sus análogos estructurales durante los 4 años anteriores.

1.8.2.1 Selección de sedimentos

Para los estudios aerobios se utilizarán normalmente dos sedimentos (7). Los dos sedimentos seleccionados tienen que ser distintos en cuanto a contenido de carbono orgánico y textura. Un sedimento ha de tener un elevado contenido de carbono orgánico (2.5-7.5%) y una textura fina, y el otro, un bajo contenido de carbono orgánico (0.5-2.5%) y una textura gruesa. La diferencia en cuanto al contenido de carbono orgánico debe ser

² Como estas soluciones de absorción alcalinas absorben también el dióxido de carbono del aire de la ventilación y el formado por la respiración en los experimentos aerobios, tienen que cambiarse a intervalos regulares para evitar su saturación y, así, la pérdida de su capacidad de absorción.

normalmente, al menos, del 2%. Se entiende por "textura fina" un contenido de [arcilla+limo]³ >50% y por "textura gruesa", un contenido de [arcilla+limo] de <50%. La diferencia en cuanto al contenido de [arcilla+limo] debe ser normalmente, al menos, del 20%. En los casos en que una sustancia química pueda llegar también a las aguas marinas, al menos uno de los sistemas de sedimentos acuáticos deberá ser de origen marino.

Para el estudio estrictamente anaerobio, deben tomarse muestras de dos sedimentos (incluidas sus aguas asociadas) de las zonas anaerobias de las masas de agua superficiales (7). Tanto el sedimento como las fases acuáticas tienen que manejarse y transportarse cuidadosamente en condiciones de exclusión de oxígeno.

Puede haber otros parámetros que sean importantes para la selección de los sedimentos y que deban considerarse caso por caso. Por ejemplo, el pH de los sedimentos sería importante para ensayar sustancias químicas cuando su transformación y/o adsorción pueda depender de éste. La dependencia de la adsorción con respecto al pH podría venir dada por la pK_a de la sustancia de ensayo.

1.8.2.2 Caracterización de las muestras sedimento-agua

En el cuadro a continuación se resumen los parámetros clave que deben medirse e indicarse (con referencia al método utilizado) tanto para el agua como para el sedimento, y la fase del ensayo en la que deben determinarse. En el apartado de referencias, puntos (18)(19)(20) y (21), se dan, a título informativo, los métodos de determinación de estos parámetros.

Además, puede ser necesario medir e indicar caso por caso otros parámetros (por ejemplo, para las aguas dulces: partículas, alcalinidad, dureza, conductividad y NO_3/PO_4 (proporción y valores de cada compuesto); para los sedimentos: capacidad de intercambio de cationes, capacidad de retención de agua, carbonatos, fósforo y nitrógeno totales; y para los sistemas marinos: salinidad. El análisis de los sedimentos y el agua para detectar nitratos, sulfatos, hierro biodisponible y posiblemente otros aceptadores de electrones puede ser útil también al valorar las condiciones redox, especialmente en relación con la transformación anaerobia.

Medición de parámetros para la caracterización de las muestras agua-sedimentos (7)(22)(23)

| Parámetro | Fase del procedimiento de ensayo | | | | | |
|---|----------------------------------|------------------|---------------------------|----------------------|-------------------|---------------------|
| | muestreo in situ | manejo posterior | inicio de la aclimatación | al inicio del ensayo | durante el ensayo | al final del ensayo |
| Agua | | | | | | |
| Origen/fuente | x | | | | | |
| Temperatura | x | | | | | |
| pH * | x | | x | x | x | x |
| COT | | | x | x | | x |
| Concentración de O ₂ | x | | x | x | x | x |
| Potencial redox* | | | x | x | x | x |
| Sedimento | | | | | | |
| Origen/fuente | x | | | | | |
| Profundidad de la capa | x | | | | | |
| pH * | | x | x | x | x | x |
| Distribución del tamaño de las partículas | | x | | | | |
| COT | | x | x | x | | x |
| Biomasa microbiana** | | x | | x | | x |
| Potencial redox* | Observación (color/olor) | | x | x | x | x |

* Los resultados de investigaciones recientes han mostrado que las mediciones de las concentraciones de oxígeno en el agua y los potenciales redox no tienen un valor mecánico ni predictivo en lo que se refiere al crecimiento y desarrollo de poblaciones microbianas en aguas superficiales (24)(25). La determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO en la toma de muestras, el inicio y el final del ensayo) y de las concentraciones de los micro/macronutrientes Ca, Mg y Mn (al inicio y al final del ensayo) en el agua, y la medición del N y el P totales en los sedimentos (en la toma de muestras y al final del ensayo) pueden ser instrumentos mejores para interpretar y evaluar las tasas y las vías de biotransformación aerobia.

** Método de la tasa de respiración microbiana (26), método de la fumigación (27) o mediciones de recuento en placas (por ejemplo, bacterias, actinomicetos, hongos y colonias totales) para estudios anaerobios; tasa de metanogénesis para estudios anaerobios.

1.8.3 Recogida, manejo y almacenamiento

1.8.3.1 Recogida

Para la toma de muestras de sedimentos, deberá utilizarse el proyecto de Directriz ISO sobre la toma de muestras de sedimentos de fondo (8). Las muestras de sedimento se tomarán de toda la capa superior de 5 a 10 cm del sedimento. El agua asociada debe recogerse del mismo lugar y al mismo

³ [Arcilla+limo] es la fracción mineral del sedimento con un tamaño de partícula < 50 µm.

tiempo que el sedimento. Para el estudio anaerobio, las muestras de sedimento y agua asociada deben tomarse en condiciones de exclusión de oxígeno (28) (véase el apartado 1.8.2.1). En la bibliografía se describen algunos aparatos de toma de muestras (8) (23).

1.8.3.2 *Manejo*

El sedimento se separa del agua por filtración y se tamiza por vía húmeda a través de una criba de 2 mm utilizando el agua del lugar de recogida sobrante que luego se tira. A continuación, las cantidades conocidas de sedimentos y agua se mezclan en la proporción deseada (véase el apartado 1.9.1) en los recipientes de incubación y se preparan para el período de aclimatación (véase el apartado 1.8.4). Para el estudio anaerobio, todas las etapas del manejo tiene que llevarse a cabo en condiciones de exclusión de oxígeno (29)(30)(31)(32) y (33).

1.8.3.3 *Almacenamiento*

Se recomienda encarecidamente utilizar sedimentos y agua recién recogidos, pero, si es necesario el almacenamiento, el sedimento y el agua tiene que tamizarse como se ha descrito anteriormente y almacenarse juntos, empapados en agua (en una capa de agua de 6-10 cm), en la oscuridad y a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}^4$ durante un máximo de 4 semanas (7)(8)(23). Las muestras utilizadas par estudios aerobios tienen que almacenarse de manera que el aire pueda acceder libremente (por ejemplo, en recipientes abiertos), mientras que las de estudios anaerobios tiene que estar en condiciones de exclusión de oxígeno. No debe haber congelación del sedimento y el agua ni secado del sedimento durante el transporte y el almacenamiento.

1.8.4 **Preparación de las muestras de sedimento/agua para el ensayo**

Tiene que haber un período de aclimatación antes de añadir la sustancia de ensayo, teniendo en cuenta que cada muestra de sedimento/agua ha de colocarse en el recipiente de incubación que se vaya a usar en el ensayo principal, y que la aclimatación ha de llevarse a cabo exactamente en las mismas condiciones que la incubación para el ensayo (véase el apartado 1.9.1). El período de aclimatación es el tiempo necesario para alcanzar una estabilidad razonable del sistema, expresada mediante el pH, la concentración de oxígeno en el agua, el potencial redox del sedimento y el agua, y la separación macroscópica de las fases. El período de aclimatación debe durar normalmente entre una y dos semanas y no debe superar las cuatro semanas. Se indicarán los resultados de las determinaciones efectuadas durante este período.

1.9 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.9.1 **Condiciones del ensayo**

El ensayo deberá hacerse en el aparato de incubación (véase el apartado 1.8.1) con una proporción agua/sedimento en volumen entre 3:1 y 4:1, y una capa de sedimento de 2,5 cm (± 0.5 cm). Se recomienda una cantidad mínima de sedimento de 50 g (en peso seco) por recipiente de incubación.

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura constante dentro de un intervalo de 10 a 30 °C. Se considera apropiada una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. En su caso, podría considerarse otra temperatura más baja (por ejemplo, 10°C) en determinados casos concretos, según la información que desee obtenerse del ensayo. Deberá controlarse e indicarse la temperatura de incubación.

1.9.2 **Tratamiento y aplicación de la sustancia de ensayo**

Se utilizará una única concentración para el ensayo⁵. Para productos fitosanitarios aplicados directamente a las masas de agua, la dosificación máxima indicada en la etiqueta debe tomarse como la tasa de aplicación máxima calculada basándose en la superficie del agua en el recipiente de ensayo. En todos los demás casos, la concentración que ha de emplearse tiene que basarse en las previsiones de emisiones medioambientales. Se procurará aplicar una concentración adecuada de la sustancia de ensayo a fin de caracterizar la vía de transformación y la formación y la desaparición de productos de transformación. Puede resultar necesario aplicar dosis superiores (por ejemplo, 10 veces más) cuando las concentraciones de la sustancia de ensayo estén próximas a los límites de detección al inicio del estudio y/o cuando no puedan detectarse fácilmente productos de transformación importantes que estén presentes al 10% de la tasa de aplicación de la sustancia de ensayo. Sin embargo, si se usan concentraciones de ensayo más altas, no deberán tener un efecto perjudicial significativo en la actividad microbiana del sistema sedimento-agua. Para conseguir una concentración constante de la sustancia de ensayo en recipientes de diferentes dimensiones puede considerarse adecuado un ajuste según la cantidad del material aplicado, basándose en la altura de la columna de agua en el recipiente en relación con la profundidad del agua en el campo (que se supone que es 100 cm, aunque pueden utilizarse otras alturas). En el anexo 4 se da un ejemplo de cálculo.

El procedimiento ideal es aplicar la sustancia de ensayo como una solución acuosa en la fase acuosa del sistema de ensayo. Si es inevitable, se permite el uso de cantidades pequeñas de disolventes miscibles con agua (como la acetona y el etanol) para la aplicación y distribución de la sustancia de ensayo, pero estas cantidades no deben superar el 1% v/v ni tener efectos perjudiciales para la actividad microbiana del sistema de ensayo. Debe procederse con cuidado al generar la solución acuosa de la sustancia de ensayo: puede resultar necesario utilizar aparatos de columnas y pre-mezclado para asegurar una homogeneidad completa. Tras añadir la solución acuosa al sistema de ensayo, se recomienda mezclar suavemente la fase acuosa, removiendo el sedimento lo menos posible.

No se recomienda por lo general el uso de productos formulados ya que los ingredientes de la fórmula pueden afectar a la distribución de la sustancia de ensayo y/o los productos de transformación entre las fases acuosa y sedimentaria. No obstante, en el caso de sustancias de ensayo poco solubles en agua, su utilización puede constituir una alternativa apropiada .

El número de recipientes de incubación depende del número de tiempos de muestreo (véase el apartado 1.9.3). Debe incluirse un número suficiente de sistemas de ensayo de manera que puedan sacrificarse dos sistemas en cada tiempo de muestreo. Cuando se empleen unidades de control de cada sistema de sedimento acuático, éstas no deben tratarse con la sustancia de ensayo. Las unidades de control pueden utilizarse para determinar la biomasa microbiana del sedimento y el carbono orgánico total del agua y del sedimento al final del estudio. Dos de las unidades de control (es decir, una unidad de control de cada sedimento acuático) pueden utilizarse para controlar los parámetros requeridos en el sedimento y el agua durante el período de

⁴ Estudios recientes han mostrado que el almacenamiento a 4°C puede dar lugar a una disminución del contenido de carbono orgánico del sedimento lo cual, a su vez, puede provocar una disminución de la actividad microbiana (34).

⁵ Puede ser útil un ensayo con una segunda concentración para sustancias químicas que lleguen a las aguas superficiales por diferentes vías de entrada en concentraciones significativamente diferentes, siempre que la concentración más baja pueda analizarse con suficiente exactitud.

aclimatación (véase el cuadro del apartado 1.8.2.2). Hay que incluir dos unidades de control adicionales en caso de que la sustancia de ensayo se aplique mediante un disolvente para medir los efectos negativos del sistema de ensayo en la actividad microbiana.

1.9.3 Duración del ensayo y muestreo

La duración del experimento no superará normalmente los 100 días (6). El experimento ha de continuar hasta que queden establecidas la vía de degradación y el modelo de distribución sedimento/agua o cuando el 90% de la sustancia de ensayo se haya disipado por transformación y/o volatilización. El número de tiempos de muestreo debe ser seis, como mínimo, (incluido el tiempo 0), teniendo en cuenta que deberá hacerse un estudio opcional preliminar (véase el apartado 1.9.4) para establecer un régimen de muestreo adecuado y la duración del ensayo, a menos que se disponga de datos suficientes sobre la sustancia de ensayo a partir de estudios previos. Para las sustancias de ensayo hidrofóbicas, puede ser necesaria la inclusión de otros puntos de muestreo durante el período inicial del estudio a fin de determinar la tasa de distribución entre las fases acuosa y sedimentaria.

A los tiempos de muestreo adecuados, se separan los recipientes de incubación completos (copias) para su análisis. Se analizan por separado el sedimento y el agua que sobrenada⁶. El agua superficial tiene que separarse con cuidado procurando remover el sedimento lo menos posible. La extracción y caracterización de la sustancia de ensayo y los productos de transformación deben hacerse conforme a procedimientos analíticos adecuados. Se pondrá cuidado en separar el material que pueda haber sido adsorbido en el recipiente de incubación o los tubos de interconexión utilizados para atrapar sustancias volátiles.

1.9.4 Ensayo preliminar opcional

Si no puede calcularse la duración ni el régimen de muestreo a partir de otros estudios sobre la sustancia de ensayo, puede resultar adecuado un ensayo preliminar opcional, que debe hacerse en las mismas condiciones de ensayo propuestas para el estudio definitivo. Si se lleva a cabo el ensayo preliminar, se informará brevemente sobre sus condiciones experimentales y sus resultados.

1.9.5 Mediciones y análisis

Se medirá y se indicará la concentración de la sustancia de ensayo y los productos de transformación en cada tiempo de muestreo en el agua y el sedimento (como concentración y como porcentaje de la sustancia aplicada). En general, deberán identificarse los productos de transformación detectados a $\geq 10\%$ de la radiactividad aplicada en todo el sistema agua-sedimento en cualquier tiempo de muestreo, a no ser que esté razonablemente justificado no hacerlo. Habrá de tomarse en consideración la identificación de los productos de transformación cuyas concentraciones aumenten continuamente durante el estudio, aunque las concentraciones no superen los límites indicados anteriormente, ya que este aumento puede indicar persistencia. Este aspecto se considerará caso por caso, justificándolo debidamente en el informe.

Los resultados de los sistemas de fijación de gases/sustancias volátiles (CO_2 y otros, por ejemplo, compuestos orgánicos volátiles) deberán indicarse en cada tiempo de muestreo. Se indicarán las tasas de mineralización. Asimismo, se indicarán los residuos no extraíbles (ligados) en el sedimento en cada punto de muestreo.

2 RESULTADOS

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

En cada tiempo de muestreo se calculará el balance total de materia o la recuperación (véase el apartado 1.7.1) de la radiactividad añadida. Los resultados deberán indicarse en porcentaje de la radiactividad añadida. La distribución de la radiactividad entre el agua y el sedimento se expresará en concentraciones y porcentajes en cada tiempo de muestreo.

La semivida, el DT_{50} y, en su caso, el DT_{75} y el DT_{90} deberán calcularse junto con sus límites de confianza (véase el apartado 1.7.3). Podrá obtenerse información sobre la tasa de disipación de la sustancia de ensayo en el agua y el sedimento mediante el uso de instrumentos de evaluación adecuados. Estos instrumentos pueden ir desde la aplicación de cinética de pseudo primer orden a técnicas empíricas de ajuste de curvas con soluciones gráficas o numéricas y evaluaciones más complejas utilizando, por ejemplo, modelos unicompartmentales o multicompartimentales. Para más información puede consultarse la bibliografía correspondiente (35)(36)(37).

Todos los planteamientos al respecto tienen sus ventajas e inconvenientes y varían considerablemente en cuanto a complejidad. El supuesto de una cinética de primer orden puede ser una simplificación excesiva de los procesos de degradación y distribución, pero, cuando es posible, da un término (constante de velocidad o semivida) que es fácilmente comprensible y valioso en la modelización por simulación y en los cálculos de las concentraciones previstas en el medio ambiente. Los planteamientos empíricos o las transformaciones lineales pueden dar lugar a un mejor ajuste de las curvas a los datos y, por tanto, permitir una mejor estimación de las semividas, los valores DT_{50} y, en su caso, los DT_{75} y DT_{90} . Sin embargo, el uso de las constantes derivadas es limitado. Los modelos compartimentales pueden generar una serie de constantes de valor útiles en la evaluación de riesgos que describen la velocidad de degradación en diferentes compartimentos y la distribución de la sustancia química. Asimismo, estos modelos deben utilizarse para el cálculo de constantes de velocidad en la formación y degradación de los principales productos de transformación. En todos los casos, el método elegido debe justificarse y el experimentador ha de demostrar gráfica o estadísticamente la corrección del ajuste.

⁶ Cuando pueda darse fácilmente una reoxidación rápida de los productos de la transformación anaerobia, se mantendrán las condiciones anaerobias durante el muestreo y el análisis.

3 INFORME

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe debe comprender la siguiente información:

Sustancia de ensayo:

- nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador cuando se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés;
- pureza (impurezas) de la sustancia de ensayo;
- pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad molar (si procede).

Sustancias de referencia:

- Nombre químico y estructura de las sustancias de referencia utilizadas para caracterizar y/o identificar los productos de transformación.

Sedimentos y aguas del ensayo:

- ubicación y descripción de los lugares donde se han tomado las muestras de sedimentos acuáticos incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación;
- toda la información sobre la recogida, almacenamiento (si lo hay) y aclimatación de los sistemas agua-sedimento;
- características de las muestras agua-sedimento según lo indicado en el cuadro del apartado 1.8.2.2.

Condiciones de ensayo:

- sistema de ensayo utilizado (por ejemplo, sistema de flujo, sistema biométrico, forma de ventilación, método de agitado, volumen de agua, masa del sedimento, grosor de la capa de sedimento y agua, dimensión del recipiente de prueba, etc.)
- aplicación de la sustancia de ensayo al sistema de ensayo: concentración de ensayo utilizada, número de copias y testigos, forma de aplicación de la sustancia de ensayo (por ejemplo, utilización de disolventes, en su caso) etc.
- temperatura de incubación;
- tiempos de muestreo;
- métodos de extracción y sus rendimientos, así como métodos analíticos y límites de detección;
- métodos de caracterización/identificación de productos de transformación;
- desviaciones del protocolo de ensayo o de las condiciones de ensayo durante el estudio.

Resultados:

- cifras en bruto de los análisis representativos (todos los datos en bruto tienen que almacenarse en el archivo BPL);
- repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados;
- tasas de recuperación (en el apartado 1.7.1 se dan los valores porcentuales para un estudio válido);
- tablas de resultados expresada en % de la dosis aplicada y en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en el agua, el sedimento y el sistema completo (sólo %) para la sustancia de ensayo y, si procede, para los productos de transformación y la radiactividad no extraíble;
- balance de materia durante y al final de los estudios;
- representación gráfica de la transformación en las fracciones acuosa y sedimentaria y en el sistema completo (incluida la mineralización);
- tasas de mineralización;
- semivida, DT_{50} , y, en su caso, DT_{75} y DT_{90} de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación, incluyendo límites de confianza en el agua, el sedimento y el sistema completo;
- valoración de la cinética de transformación de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación;
- vía de transformación propuesta, si procede;
- discusión de los resultados.

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- (4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality - Sampling - Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spittler M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.
- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.
- (18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol. 329-338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.
- (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

- (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499-1509.
- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597-3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961-968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 39, 187 - 203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 33, 47 - 60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, pp 1349-1354.

ANEXO 1

DIRECTRIZ SOBRE LOS SISTEMAS DE ENSAYO AEROBIOS Y ANAEROBIOS

Sistema de ensayo aerobio

El sistema de ensayo aerobio descrito en este método de ensayo consiste en una capa de agua aerobia (cuyas concentraciones de oxígeno oscilan normalmente entre 7 y $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y una capa de sedimento, aerobio en la superficie y anaerobio por debajo de la superficie (cuyos potenciales redox medios (E_h) oscilan normalmente en la zona anaerobia del sedimento entre -80 y -190 mV). Se hará circular aire húmedo sobre la superficie del agua en cada unidad de incubación para mantener suficiente oxígeno en el espacio libre.

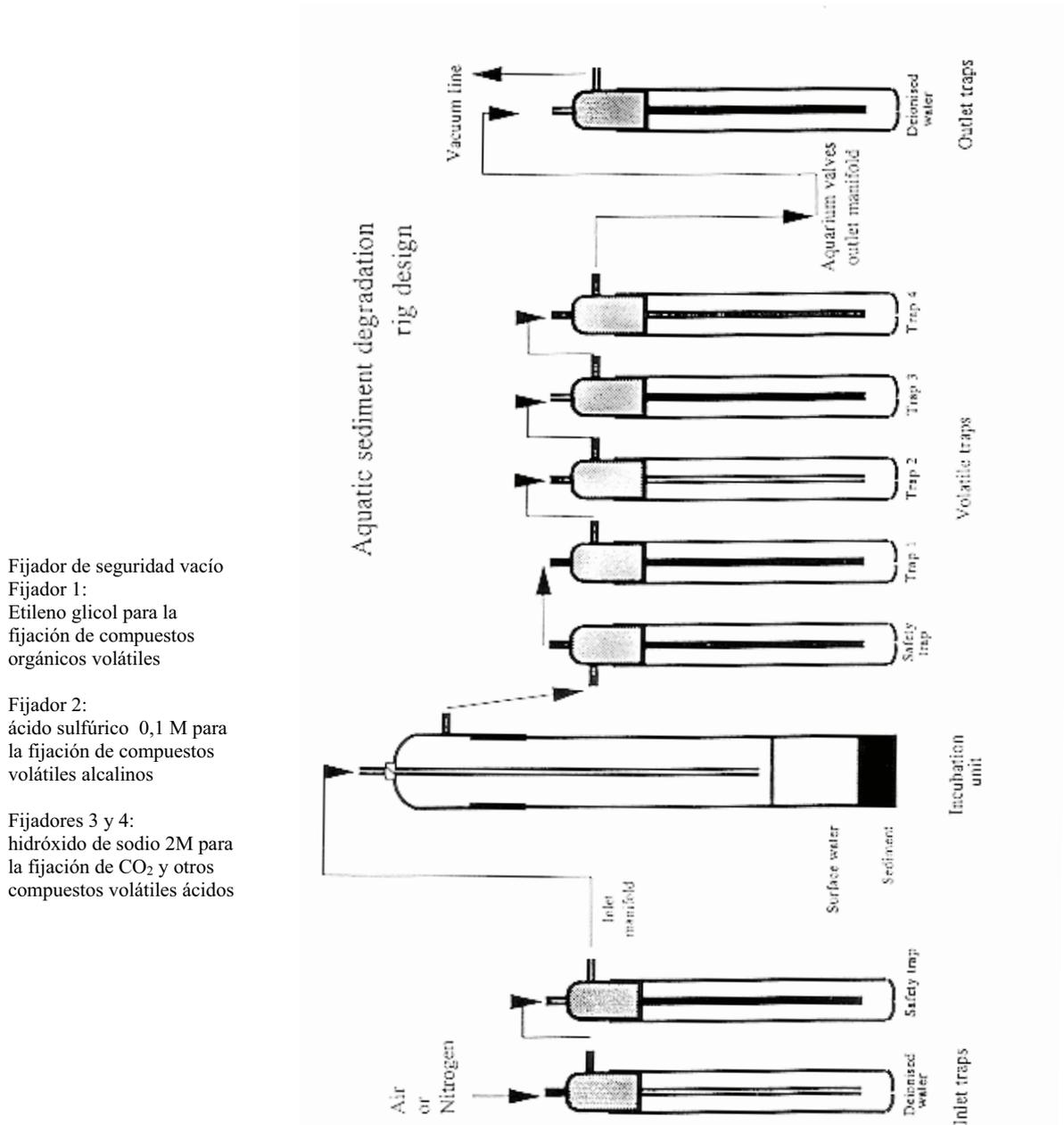
Sistema de ensayo anaerobio

Para el sistema de ensayo anaerobio, el procedimiento del ensayo es esencialmente el mismo que el descrito para el sistema aerobio con la excepción de que el nitrógeno humedecido se pasa por la superficie del agua en cada unidad de incubación para mantener un espacio libre de nitrógeno. El sedimento y el agua se consideran anaerobios cuando el potencial redox (E_h) sea inferior a -100 mV.

En el ensayo anaerobio, la valoración de la mineralización incluye la medición del dióxido de carbono y el metano liberados.

ANEXO 2

EJEMPLO DE APARATO DE FLUJO



Fijador de seguridad vacío
Fijador 1:
Etileno glicol para la fijación de compuestos orgánicos volátiles

Fijador 2:
ácido sulfúrico 0,1 M para la fijación de compuestos volátiles alcalinos

Fijadores 3 y 4:
hidróxido de sodio 2M para la fijación de CO₂ y otros compuestos volátiles ácidos

Aquatic sediment degradation rig design: Esquema del equipo para el estudio de la degradación en sedimentos acuáticos

Air or Nitrogen: Aire o nitrógeno

Inlet traps: Fijadores de entrada

Inlet manifold: Distribuidor de entrada

Sediment: Sedimento

Safety trap: Fijador de seguridad

Trap 2: Fijador 2

Trap 4: Fijador 4

Aquarium valves outlet manifold: Distribuidor de salida con válvulas de acuario

Vacuum line: Línea de vacío

Outlet traps: Fijadores de salida

Deionised water: Agua desionizada

Safety trap: Fijador de seguridad

Surface water: Agua superficial

Incubation unit: Unidad de incubación

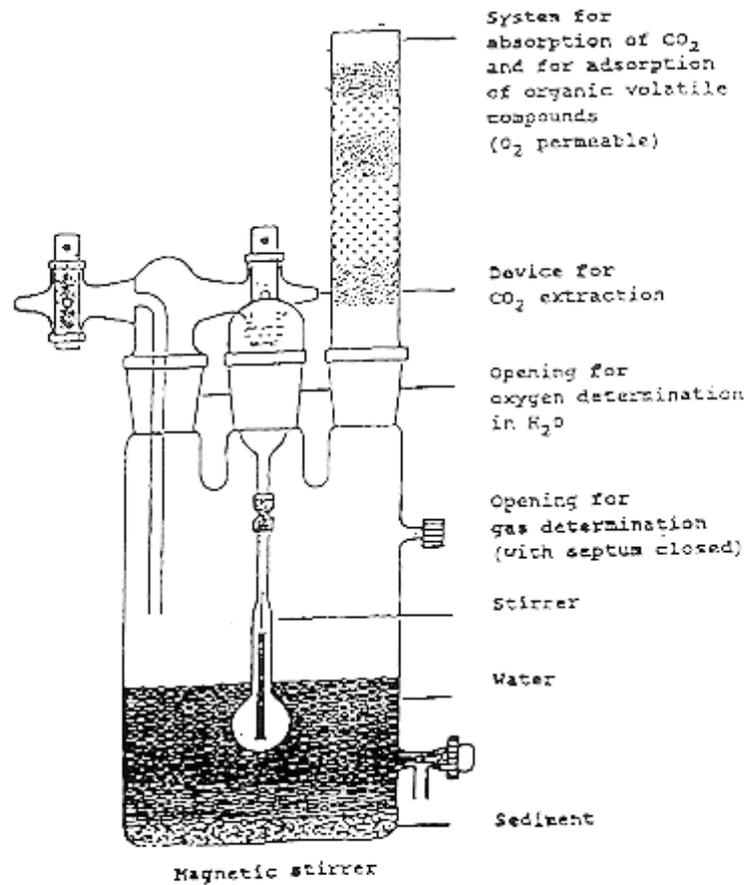
Trap 1: Fijador 1

Trap 3: Fijador 3

Deionised water: Agua desionizada

ANEXO 3

EJEMPLO DE APARATO BIOMÉTRICO



System for absorption of CO_2 and for adsorption of organic volatile compounds (O_2 permeable): Sistema para la absorción de CO_2 y la adsorción de compuestos orgánicos volátiles (permeable al O_2)

Device for CO_2 extraction : Dispositivo para la extracción de CO_2

Opening for oxygen determination in H_2O : Abertura para la determinación de oxígeno en el agua

Opening for gas determination (with septum closed): Abertura para la determinación de gases (con el septum cerrado)

Stirrer : Agitador

Water : Agua

Sediment : Sedimento

Magnetic stirrer : Agitador magnético

ANEXO 4

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA DOSIS QUE DEBE APLICARSE A LOS RECIPIENTES DE ENSAYO

| | |
|---|-------------------------|
| Diámetro interno del cilindro: | = 8 cm |
| Altura de la columna de agua sin incluir el sedimento: | = 12 cm |
| Área de la superficie: $3,142 \times 4^2$ | = 50,3 cm ² |
| Tasa de aplicación: 500 g de la sustancia de ensayo/ha corresponde a 5 µg/cm ² | |
| Total µg: $5 \times 50,3$ | = 251,5 µg |
| Ajuste de la cantidad en relación con una altura de 100 cm. $12 \times 251,5 \div 100$ | = 30,18 µg |
| Volumen de la columna de agua: $50,3 \times 12$ | = 603 ml |
| Concentración en el agua: $30,18 \div 603$ | = 0,050 µg/ml o 50 µg/l |

ANEXO 2I

C.21. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL NITRÓGENO

1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 216 (2000).

1.1 INTRODUCCIÓN

Este método de ensayo es un método de laboratorio destinado a investigar los efectos a largo plazo de productos químicos, tras una exposición única, en la transformación del nitrógeno por los microorganismos del suelo. El ensayo se basa principalmente en las recomendaciones de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (1). Sin embargo, se han tenido en cuenta otras directrices, como las del Biologische Bundesanstalt (2) de Alemania, la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos (3) la Sociedad de Química y Toxicología Medioambientales (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, SETAC) (4) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) (5). En un taller de la OECD sobre selección de suelos/sedimentos, celebrado en Belgirate, Italia, en 1995 (6) se acordó el número y el tipo de suelos que deben usarse en este ensayo. Las recomendaciones sobre recogida, manejo y almacenamiento de muestras de suelo se basan en un documento orientativo de la ISO (7) y en las recomendaciones del taller de Belgirate. En la valoración y evaluación de las características de las sustancias de ensayo, puede resultar necesaria la determinación de los efectos de la actividad microbiana en el suelo, por ejemplo, cuando se requieran datos sobre los posibles efectos secundarios de los productos fitosanitarios en la microflora del suelo o cuando sea previsible la exposición de los microorganismos del suelo a los productos químicos distintos de los fitosanitarios. El ensayo de transformación del nitrógeno se lleva a cabo para determinar los efectos de estos productos químicos en la microflora del suelo. Si se ensayan productos agroquímicos (por ejemplo, productos fitosanitarios, abonos y productos químicos para la silvicultura), se llevarán a cabo tanto ensayos de transformación del nitrógeno como del carbono. Si se ensayan productos no agroquímicos, es suficiente el ensayo de transformación del nitrógeno. Sin embargo, si los valores EC_{50} del ensayo de transformación del nitrógeno de estos productos químicos se sitúan dentro del intervalo encontrado para los inhibidores de la nitrificación disponibles en el comercio (por ejemplo, la nitrapirina), puede hacerse un ensayo de transformación del carbono para obtener más información.

Los suelos están formados por componentes vivos y no vivos que se dan en mezclas complejas y heterogéneas. Los microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y transformación de la materia orgánica en los suelos fértiles. Existen muchas especies que contribuyen de diversas maneras a la fertilidad del suelo. Cualquier interferencia a largo plazo en estos procesos bioquímicos podría perturbar el ciclo de los nutrientes y alterar la fertilidad del suelo. La transformación del carbono y del nitrógeno se da en los suelos fértiles. Aunque las comunidades microbianas responsables de estos procesos difieren de unos suelos a otros, las vías de transformación son esencialmente las mismas.

Este método de ensayo está destinado a detectar los efectos negativos a largo plazo de una sustancia en el proceso de transformación del nitrógeno en los suelos aerobios de superficie. El método también permite calcular los efectos de una sustancia en la transformación del carbono por la microflora del suelo. La formación de nitratos se produce tras la degradación de los enlaces carbono-nitrógeno. Por tanto, si se encuentran índices iguales de producción de nitratos en suelos tratados y suelos de control, es muy probable que las principales rutas de degradación del carbono estén intactas y funcionales. El sustrato elegido para el ensayo (la harina de alfalfa) tiene una proporción carbono/nitrógeno favorable (normalmente entre 12/1 y 16/1). Por eso, la privación de carbono durante el ensayo es reducida y las comunidades microbianas, si resultan dañadas por una sustancia química, pueden recobrar dentro de un plazo de 100 días.

Los ensayos a partir de los cuales se desarrolló este método estaban pensados principalmente para sustancias respecto a las cuales puede preverse la cantidad que llegará al suelo. Éste es el caso, por ejemplo, de los productos fitosanitarios cuyo índice de aplicación al campo es conocido. Para los productos agroquímicos, es suficiente el ensayo de dos dosis con arreglo al índice de aplicación estimado o previsto. Los productos agroquímicos pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados. Sin embargo, el ensayo no se limita a los productos agroquímicos. Cambiando tanto las cantidades de la sustancia de ensayo aplicada al suelo como la manera en que se evalúan los datos, el ensayo puede usarse también para productos químicos cuando se desconozca la cantidad de estos que llegará al suelo. De este modo, en el caso de los productos químicos distintos de los agrícolas, se determinan los efectos de una serie de concentraciones en la transformación del nitrógeno. A continuación, se utilizan los datos de estos ensayos para trazar una curva dosis-respuesta y calcular los valores EC_x , donde x es el porcentaje de efecto definido.

1.2 DEFINICIONES

Transformación del nitrógeno: es la degradación última por microorganismos de materia orgánica que contenga nitrógeno, mediante un proceso de amonificación y nitrificación, hasta llegar al nitrato inorgánico respectivo.

EC_x (concentración efectiva): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un porcentaje x de inhibición de la transformación de nitrógeno en nitrato.

EC_{50} (concentración efectiva mediana): es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un 50% de inhibición de la transformación de nitrógeno en nitrato.

1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Ninguno.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Al suelo tamizado se le añade harina vegetal y, a continuación, se trata una parte con la sustancia de ensayo y se deja la otra sin tratar (control). Cuando se ensayan productos agroquímicos, se recomienda un mínimo de dos concentraciones de ensayo, que deben elegirse en relación con la concentración

más alta prevista para el campo. Después de 0,7, 14 y 28 días de incubación, se extraen muestras de suelos tratados y de control con un disolvente apropiado y se determinan las cantidades de nitrato en los extractos. El índice de formación de nitratos en las muestras tratadas se compara con el de las de control y se calcula el porcentaje de desviación de las muestras tratadas respecto a las de control. Todos los ensayos tendrán una duración mínima de 28 días. Si, al 28º día, la diferencia entre los suelos tratados y los no tratados es igual o superior al 25%, se continuarán las mediciones hasta un máximo de 100 días. Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se añadirá a las muestras de suelo una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo y se medirán al cabo de 28 días de incubación la cantidades de nitratos formadas en las muestras tratadas y de control. Los resultados de los ensayos con concentraciones múltiples se analizarán utilizando un modelo de regresión y se calcularán los valores EC_x (es decir, EC_{50} , EC_{25} y/o EC_{10}). Véanse las definiciones.

1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Las evaluaciones de los resultados de los ensayos se basan en diferencias relativamente pequeñas (es decir, un valor medio de $\pm 25\%$) entre concentraciones de nitratos en las muestras tratadas y de control, de modo que grandes variaciones en las muestras de control pueden dar lugar a resultados falsos. Por ello, la variación entre muestras de control en paralelo debe ser inferior al $\pm 15\%$.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1 Equipo

Se utilizarán recipientes de ensayo hechos de material químicamente inerte. Estos recipientes deben ser de capacidad adecuada de acuerdo con el procedimiento utilizado para la incubación de suelos, es decir, incubación en una muestra única o en una serie de muestras separadas (véase el apartado 1.7.1.2). Hay que procurar reducir al mínimo la pérdida de agua y permitir el intercambio de gas durante el ensayo (por ejemplo, los recipientes pueden cubrirse con láminas de polietileno perforado). Cuando se ensayen sustancias volátiles, deben usarse recipientes sellables y herméticos cuyo tamaño sea tal que aproximadamente un cuarto de su volumen esté ocupado por la muestra de suelo.

Se utilizará equipo de laboratorio estándar, incluyendo:

- mecanismo de agitación: agitador mecánico o equipo equivalente,
- dispositivo de centrifugado (3000 g) o filtrado (utilizando papel de filtro sin nitratos),
- instrumental de sensibilidad y reproductibilidad adecuadas para el análisis de nitratos.

1.6.2 Selección y número de suelos

Se utilizará un único suelo cuyas características recomendadas serán las siguientes:

- contenido de arena: entre el 50% y el 75%,
- pH: 5,5 - 7,5,
- contenido de carbono orgánico: 0,5 - 1,5%
- debe medirse la masa microbiana (8) (9), cuyo contenido de carbono tiene que ser al menos el 1% del total de carbono orgánico en el suelo.

En la mayoría de los casos, un suelo con estas características representa la situación más desfavorable, ya que la adsorción de la sustancia química de ensayo es mínima y su disponibilidad para la microflora es máxima. Por lo tanto, no son necesarios, por lo general, ensayos de otros suelos. Sin embargo, en algunas circunstancias, por ejemplo, cuando la sustancia de ensayo esté indicada principalmente para determinados suelos, como los suelos forestales ácidos, o en el caso de productos químicos cargados electrostáticamente, puede resultar necesario utilizar algún otro suelo.

1.6.3 Recogida y almacenamiento de muestras de suelo

1.6.3.1 Recogida

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del campo de donde se recoja la tierra para el ensayo. Se necesitan datos, entre otras cosas, de la localización exacta, la cubierta vegetal, fechas de tratamiento con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos orgánicos e inorgánicos, aplicación de sustancias biológicas o contaminación accidental. El lugar elegido para la recogida de suelo tiene que ser tal que permita un uso a largo plazo. Se consideran adecuados los pastos permanentes, los campos con cosechas anuales de cereales (excepto el maíz) o los abonos verdes sembrados densamente. El lugar donde se recojan las muestras no debe haberse tratado con productos fitosanitarios durante un mínimo de un año antes de la recogida de éstas. Además, no debe haberse aplicado ningún abono orgánico durante al menos seis meses. El uso de abonos minerales sólo es aceptable cuando esté en concordancia con las necesidades del cultivo, en ese caso no deben tomarse muestras hasta transcurridos, al menos, tres meses desde la aplicación del abono. Debe evitarse el uso de suelo tratado con abonos con efectos biocidas conocidos (por ejemplo, cianamida de calcio).

Hay que evitar la toma de muestras durante o inmediatamente después de periodos prolongados (de más de 30 días) de sequía o encharcamiento. En el caso de los suelos arados, deben tomarse muestras a una profundidad de 0 a 20 cm. Cuando se trate de pastizales u otros suelos que no se aren durante periodos más largos (al menos un ciclo de cultivo), la profundidad máxima del muestreo puede ser ligeramente superior a 20 cm (por ejemplo, 25 cm).

Las muestras de suelo deben transportarse en recipientes y en condiciones de temperatura que garanticen que las propiedades iniciales del suelo no se alteren significativamente.

1.6.3.2 Almacenamiento

Es preferible el uso de muestras de suelo recién recogidas. Si no se puede evitar el almacenamiento en el laboratorio, las muestras de suelo pueden guardarse en la oscuridad a $4\pm 2^\circ\text{C}$ durante un máximo de tres meses. Durante el almacenamiento, debe asegurarse el mantenimiento de condiciones aerobias. Si se recogen muestras de suelo de zonas que estén congeladas durante, al menos, tres meses al año, puede considerarse la posibilidad de

almacenarlas durante seis meses a entre - 18 °C y - 22°C. Se medirá la biomasa microbiana de las muestras almacenadas antes de cada experimento. La cantidad de carbono en la biomasa debe ser como mínimo el 1% del total de carbono orgánico de la muestra de suelo (véase el apartado 1.6.2)

1.6.4 Manejo y preparación del suelo para el ensayo

1.6.4.1 Preincubación

Cuando las muestras de suelo hayan estado almacenadas (véase el apartado 1.6.3.2), se recomienda preincubar durante un período de entre 2 y 28 días. La temperatura y la humedad del suelo durante la preincubación deben ser semejantes a las que se den durante el ensayo (véanse los apartados 1.6.4.2 y 1.7.1.3).

1.6.4.2 Características fisicoquímicas

Se separarán manualmente los objetos grandes (por ejemplo, piedras, trozos de plantas, etc.) de la muestra de suelo y, a continuación, se tamizará la muestra por vía húmeda sin secar en exceso para obtener un tamaño de las partículas no superior a 2 mm. Deberá ajustarse el contenido de humedad de la muestra con agua destilada o desionizada para llegar a un valor entre el 40% y el 60% de la capacidad máxima de retención de agua.

1.6.4.3 Adición de sustrato orgánico

La muestra de suelo debe mezclarse con un sustrato orgánico adecuado, por ejemplo, harina de alfalfa-hierba-forraje verde (principal componente: *Medicago sativa*) con una proporción C/N entre 1271 y 16/1. La proporción alfalfa-muestra de suelo recomendada es 5 g de alfalfa por kilo de muestra (peso en seco).

1.6.5 Preparación de la sustancia de ensayo para la aplicación al suelo

La sustancia de ensayo se aplica normalmente utilizando un vehículo. El vehículo puede ser agua (para las sustancias solubles en el agua) o un sólido inerte como arena fina de cuarzo (tamaño de las partículas: 0,1 - 0,5 mm). Deben evitarse los vehículos líquidos distintos del agua (por ejemplo, disolventes orgánicos como la acetona o el cloroformo) porque pueden dañar la microflora. Si se usa arena como vehículo, puede recubrirse con la sustancia de ensayo disuelta o suspendida en un disolvente apropiado. En tal caso, debe eliminarse el disolvente por evaporación antes de mezclarse con la muestra de suelo. Para una distribución óptima de la sustancia de ensayo en el suelo, se recomienda una proporción de 10 g de arena por kilo de suelo (peso en seco). Las muestras de control se tratarán sólo con una cantidad equivalente de agua y/o arena de cuarzo.

Cuando se ensayen sustancias químicas volátiles, deben evitarse pérdidas durante el tratamiento en la medida de lo posible y habrá que procurar conseguir una distribución homogénea en la muestra de suelo (por ejemplo, deberá inyectarse la sustancia de ensayo en la muestra en varios sitios).

1.6.6 Concentraciones de ensayo

Cuando se ensayen productos agroquímicos, deberán utilizarse al menos dos concentraciones. La concentración más baja debe corresponder, al menos, a la cantidad máxima que se prevé que llegue al suelo en la práctica mientras la concentración más alta tiene que ser un múltiplo de la concentración más baja. Las concentraciones de la sustancia de ensayo añadida al suelo se calcula suponiendo una incorporación uniforme a una profundidad de 5 cm y una densidad aparente del suelo de 1,5. Para los productos agroquímicos que se aplican directamente al suelo o para las sustancias químicas para las cuales puede calcularse la cantidad que llega al suelo, las concentraciones de ensayo recomendadas son la máxima concentración ambiental prevista (Predicted Environmental Concentration (PEC). Las sustancias destinadas a ser aplicadas a los suelos varias veces a lo largo de un ciclo tiene que ensayarse a concentraciones resultantes de multiplicar la PEC por el número máximo de aplicaciones previsto. Sin embargo, la concentración superior ensayada no debe superar diez veces el índice máximo para una aplicación. Si se ensayan productos químicos no agrícolas, se empleará una serie geométrica de, al menos, cinco concentraciones. Las concentraciones ensayadas ha de cubrir el intervalo necesario para determinar los valores EC_x .

1.7 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.7.1 Condiciones de exposición

1.7.1.1 Tratamiento y control

Cuando se ensayen productos agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en tres partes de igual peso. Dos partes se mezclarán con el vehículo que contenga el producto y la otra, con el vehículo sin el producto (control). Se recomienda un mínimo de tres copias para ambos tipos de muestras, las tratadas y las no tratadas. Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, la muestra de suelo se dividirá en seis partes de igual peso. Cinco de las muestras se mezclarán con el vehículo que contenga la sustancia de ensayo y la sexta, con el vehículo sin la sustancia. Se recomienda preparar tres copias tanto para las muestras tratadas como las de control. Debe procurarse una distribución homogénea de la sustancia de ensayo en las muestras tratadas. Durante la mezcla, se evitará la compactación de la muestra o la formación de grumos.

1.7.1.2 Incubación de las muestras de suelo

La incubación de las muestras de suelo puede hacerse de dos maneras: como dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, o como una serie de submuestras separadas de igual tamaño de suelo tratado, por una parte, y de suelo no tratado, por otra. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, el ensayo sólo debe hacerse con una serie de submuestras separadas. Cuando las muestras de suelo se incuben en una muestra única, se prepararán grandes cantidades de suelo tratado y no tratado, y se tomarán las submuestras que deban analizarse según se necesite a lo largo del ensayo. La cantidad preparada inicialmente para las muestras tratadas y para las de control dependerá del tamaño de las submuestras, el número de ejemplares utilizados para el análisis y el número máximo previsto de períodos de muestreo. Las muestras de suelo incubadas como muestra única deben mezclarse bien antes de preparar submuestras. Cuando la incubación se haga en una serie de muestras separadas, las dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, se dividirán en el número de submuestras requerido, y éstas se utilizarán según se necesite. En los experimentos en los que puedan preverse más de dos tiempos de muestreo, habrán de prepararse las submuestras suficientes, teniendo en cuenta los ejemplares y los tiempos de muestreo. Deberán incubarse, al menos, tres copias de las muestras de ensayo en condiciones aerobias (véase el apartado 1.7.1.1). Durante todos los ensayos, se utilizarán recipientes adecuados con suficiente espacio libre para evitar la aparición de condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, el ensayo sólo debe hacerse con una serie de submuestras separadas.

1.7.1.3 *Condiciones y duración del ensayo*

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. La humedad de las muestras se mantendrá durante el ensayo entre el 40% y el 60% de la capacidad máxima de retención de agua del suelo (véase el apartado 1.6.4.2) con una variación máxima del $\pm 5\%$. Podrá añadirse agua destilada y desionizada según se necesite.

La duración mínima del ensayo es de 28 días. Cuando se ensayen productos agroquímicos, se compararán los índices de formación de nitrato en las muestras tratadas y de control. Si estos índices difieren en más del 25% al 28º día, se continuará el ensayo hasta que se obtenga una diferencia igual o menor al 25% o bien durante un máximo de 100 días. En el caso de los productos químicos no agrícolas, se pondrá fin al ensayo a los 28 días. Al 28º día, se determinarán las cantidades de nitratos en las muestras tratadas y de control y se calcularán los valores EC_x .

1.7.2 **Toma de muestras y análisis de suelos**

1.7.2.1 *Calendario de toma de muestras*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, se hará el análisis de nitratos en las muestras de suelo los días 0, 7, 14 y 28. Cuando se necesite un ensayo prolongado, se harán nuevas mediciones a intervalos de 14 de días a partir del 28º día.

Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se utilizarán como mínimo cinco concentraciones de ensayo y se hará el análisis de nitratos en las muestras de suelo al principio (día 0) y al final del período de exposición (28 días). Si se considera necesario, puede añadirse una medición intermedia, por ejemplo, al séptimo día. Los datos obtenidos al 28º día se utilizarán para hallar el valor EC_x de la sustancia química. Si se desea, pueden utilizarse los datos de las muestras de control obtenidos el día 0 para indicar la cantidad inicial de nitratos en el suelo.

1.7.2.2 *Análisis de las muestras de suelo*

La cantidad de nitratos formada en cada ejemplar de muestra tratado y de control se determinará en cada tiempo de muestreo. Los nitratos se extraerán de la muestra de suelo agitándola con un disolvente de extracción adecuado, por ejemplo, una solución 0,1 M de cloruro de potasio. Se recomienda una proporción de 5 ml de KCl por gramo equivalente de suelo en peso seco. Para optimizar la extracción, los recipientes que contengan la muestra de suelo y la solución de extracción no deberán llenarse más de la mitad. Las mezclas se agitarán a 150 rpm durante 60 minutos. A continuación, se centrifugarán o filtrarán y se analizará la fase líquida para hallar los nitratos. Los extractos líquidos sin partículas pueden almacenarse antes del análisis a menos $20 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta seis meses.

2 **RESULTADOS**

2.1 **TRATAMIENTO DE RESULTADOS**

Si se hacen ensayos con productos agroquímicos, deberán registrarse las cantidades de nitratos formadas en cada copia de muestra de suelo y darse en forma de tabla los valores medios de todos los ejemplares. Se evaluarán los índices de transformación del nitrógeno mediante métodos estadísticos apropiados y generalmente aceptables (por ejemplo, test-F, nivel de significación del 5%). Las cantidades de nitrato formadas se expresarán en mg de nitrato/kg de muestra (peso seco)/día. La tasa de formación de nitrato en cada tratamiento se comparará con el de la muestra de control y se calculará el porcentaje de desviación respecto a ésta.

Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se determinará la cantidad de nitratos formada en cada copia y se trazará una curva dosis-respuesta para el cálculo de los valores EC_x . Las cantidades de nitratos (es decir, mg de nitratos/kg de muestra en peso seco) halladas en las muestras tratadas a los 28 días se compararán con las halladas en las muestras de control. A partir de estos datos, se calculará los valores porcentuales de inhibición para cada concentración de ensayo. Estos porcentajes se representarán en un gráfico en función de la concentración y, a continuación, se utilizarán procedimientos estadísticos para calcular los valores EC_x . Los límites de confianza ($p = 0,95$) para el valor EC_x calculado se hallarán también utilizando procedimientos estándar (10)(11)(12).

Las sustancias de ensayo que contengan grandes cantidades de nitrógeno pueden contribuir a las cantidades de nitratos formados durante el ensayo. Si estas sustancias se ensayan a concentraciones altas (por ejemplo, sustancias químicas que esté previsto utilizar en aplicaciones repetidas), deben incluirse en el ensayo muestras de control apropiadas (es decir, muestra de suelo más sustancia de ensayo, pero sin harina vegetal). Los datos de estas muestras de control deben tenerse en cuenta en los cálculos de la EC_x .

2.2 **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Cuando se evalúen los resultados de los ensayos con productos agroquímicos y la diferencia en los índices de formación de nitratos entre el tratamiento más bajo (es decir, la concentración máxima prevista) y la muestra de control no supere el 25% en cualquier tiempo de muestreo a partir del 28º día, el producto podrá considerarse que no tiene influencia a largo plazo en la transformación de nitrógeno en el suelo. Cuando se evalúen los resultados de ensayos con sustancias químicas no agrícolas, se utilizarán los valores EC_{50} , EC_{25} y/o EC_{10} .

3 **INFORME**

El informe del ensayo debe incluir los datos siguientes:

Identificación completa del suelo utilizado, incluyendo:

- referencia geográfica del lugar (latitud y longitud),
- información sobre la historia del lugar (es decir, cubierta vegetal, tratamientos con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos, contaminación accidental, etc.),
- tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.)
- profundidad de muestreo (cm)

- contenido de arena/limo/arcilla (% peso seco)
- pH (en agua),
- contenido de carbono orgánico (% peso seco),
- contenido de nitrógeno (% peso seco),
- concentración inicial de nitratos (mg nitratos/kg peso seco),
- capacidad de intercambio de cationes (mmol/kg),
- biomasa microbiana en porcentaje del carbono orgánico total,
- referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro,
- toda la información sobre la recogida y almacenamiento de las muestras de suelo,
- datos de la preincubación del suelo, si procede.

Sustancia de ensayo:

- naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,
- identificación química, en su caso, incluyendo fórmula estructural, pureza (es decir, en el caso de los productos fitosanitarios, el porcentaje de principio activo) y contenido de nitrógeno.

Sustrato:

- origen del sustrato,
- composición (es decir, harina de alfalfa, harina de alfalfa-hierba-forraje verde),
- contenido de carbono y nitrógeno (% peso seco),
- tamaño del tamiz (mm).

Condiciones de ensayo:

- información sobre la adición al suelo del sustrato orgánico,
- número de concentraciones de la sustancia de ensayo utilizada y, en su caso, justificación de las concentraciones seleccionadas,
- datos de la aplicación de la sustancia de ensayo al suelo,
- temperatura de incubación,
- contenido de humedad al principio y durante el ensayo,
- método de incubación del suelo utilizado (es decir, en una muestra única o en una serie de submuestras separadas),
- número de ejemplares,
- tiempos de muestreo,
- método utilizado para la extracción de nitratos del suelo.

Resultados:

- procedimiento analítico y equipo empleado para analizar los nitratos,
- tabla de resultados incluyendo los distintos valores de las mediciones de nitratos y los valores medios,
- variación entre los ejemplares de las muestras tratadas y la muestras de control,
- explicación de la correcciones efectuadas en los cálculos, si procede,
- variación porcentual de los índices de formación de nitratos en cada tiempo de muestreo o, si procede, el valor EC_{50} con un límite de confianza del 95%, otros valores EC_x (es decir, EC_{25} o EC_{10}) con intervalos de confianza, y una gráfica de la curva dosis-respuesta,
- tratamiento estadístico de los resultados,

cualquier información u observación complementaria importante para interpretar los resultados.

4 BIBLIOGRAFÍA

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.
- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

