

2. La Comisión Interministerial coordinará sus actuaciones con los órganos colegiados de la Administración General del Estado relacionados con la sociedad de la información y, especialmente, con la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, el Consejo Superior de Informática, el Consejo Asesor de Telecomunicaciones y el Consejo Asesor para la Ciencia y la Tecnología.

Artículo 4. Composición de la Comisión Interministerial de la Sociedad de la Información y de las Nuevas Tecnologías.

1. La Comisión Interministerial estará integrada por los siguientes miembros:

Presidente: El Ministro de Industria y Energía.
 Vocales: El Secretario de Estado de Política Exterior y para la Unión Europea.
 El Secretario de Estado de Justicia.
 El Secretario de Estado de Defensa.
 El Secretario de Estado de Hacienda.
 El Secretario de Estado de Educación, Universidades, Investigación y Desarrollo.
 El Secretario de Estado de la Seguridad Social.
 El Secretario de Estado de Industria y Energía.
 El Secretario de Estado de la Comunicación.
 El Secretario de Estado para la Administración Pública.
 El Subdirector del Gabinete de la Presidencia del Gobierno.
 El Subsecretario de Fomento.
 El Secretario general de Comunicaciones.
 El Subsecretario de Agricultura, Pesca y Alimentación.
 El Subsecretario de Medio Ambiente.
 Secretario: El Director general de Industria y Tecnologías de la Información del Ministerio de Industria y Energía.

2. En función del contenido de las materias a tratar, podrán incorporarse a la Comisión Interministerial, a invitación de su Presidente o a propuesta del Ministro correspondiente, los titulares de otros órganos directivos de la Administración General del Estado o de organismos públicos dependientes de la misma, así como expertos en dichas materias.

3. Sin perjuicio de las peculiaridades previstas en el presente Real Decreto, la Comisión se regirá por lo establecido en materia de órganos colegiados en el capítulo II del título II de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común. La Comisión podrá, asimismo, aprobar las normas de régimen interno que estime procedentes para el mejor desarrollo de sus trabajos.

Artículo 5. Financiación.

La financiación de las actividades contempladas en la iniciativa estratégica se realizará con cargo a los recursos presupuestarios asignados a cada Departamento ministerial.

Artículo 6. Colaboración con las Comunidades Autónomas.

Sin perjuicio de las competencias propias de los diferentes Departamentos ministeriales, la Comisión Interministerial estudiará las fórmulas más apropiadas de colaboración con las Comunidades Autónomas con el fin de acordar con cada una de ellas propuestas de actuaciones conjuntas para el desarrollo de la sociedad de la información y de las nuevas tecnologías en España.

Disposición adicional única. *Defensa y seguridad nacional.*

Las actividades para la Defensa y la seguridad nacional no serán objeto de las actuaciones de la Comisión Interministerial.

Disposición final primera. *Plazo de presentación de la iniciativa.*

La Comisión Interministerial completará la elaboración de la iniciativa estratégica en el plazo de cuatro meses, a contar desde la publicación del presente Real Decreto, y la elevará, para su aprobación, al Consejo de Ministros.

Disposición final segunda. *Entrada en vigor.*

El presente Real Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 23 de julio de 1999.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Industria y Energía,
 JOSEP PIQUÉ I CAMPS

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

16240 *ORDEN de 16 de julio de 1999 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.*

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

Mediante las Ordenes de 13 de septiembre de 1995, de 21 de febrero de 1997, de 30 de junio de 1998 y de 11 de septiembre de 1998, se han introducido diversas modificaciones en los anexos I, III, V y VI del citado Reglamento, con el objeto de incorporar a nuestro Derecho interno las Directivas de la Comisión 93/101/CEE, 94/69/CE, 96/54/CE y la 97/69/CE, respectivamente, que adaptan al progreso técnico la Directiva marco 67/548/CEE, antes citada, modificando sus anexos.

Posteriormente se ha publicado la Directiva 98/73/CE de la Comisión, de 18 de septiembre de 1998, por la que se adapta, por vigésima cuarta vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas, en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas, por lo que se hace necesario proceder a su transposición al ordenamiento

jurídico español mediante la presente Orden, que se dicta de acuerdo con la habilitación prevista en la disposición final primera del Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.

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

Artículo 1.

El anexo I 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, queda modificado en la siguiente forma:

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

b) Se adicionan las entradas que aparecen recogidas en la parte II del anexo A de la presente Orden.

Artículo 2.

El anexo 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, queda modificado como sigue:

a) El texto que figura en las partes I, II y III del anexo B de la presente Orden, se añadirá a la parte A

(Métodos de determinación de propiedades físico-químicas) del anexo V del citado Reglamento.

b) El texto que figura en la parte IV del anexo B de la presente Orden se añadirá a la parte C (Métodos de determinación de ecotoxicidad) del anexo V del mencionado Reglamento.

Disposición transitoria única.

Las sustancias peligrosas a que hace referencia el artículo 1, podrán seguir comercializándose bajo las condiciones de clasificación, envasado y etiquetado exigidas con anterioridad a la entrada en vigor de la presente Orden, por un período de seis meses a partir de dicha entrada en vigor, con el fin de que la industria pueda adoptar las medidas necesarias para su cumplimiento.

Disposición final única.

Sin perjuicio de lo dispuesto en la disposición transitoria única, la presente Orden entrará en vigor el 31 de octubre de 1999.

Madrid, 16 de julio de 1999.

ÁLVAREZ-CASCOS FERNÁNDEZ

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

Cas No 108-67-8

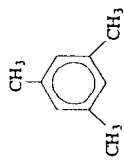
EC No 203-604-4

No 601-025-00-5

Cas No 98-83-9

EC No 202-705-0

No 601-027-00-6



ES: mesitileno

Clasificación,

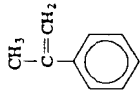
R 10 Xi; R 37 N; R 51-53

Etiquetado,

Xi		N	
R: 10-37-51/53			
S: (2-)-61			

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xi; R 37



ES: 2-fenilpropeno

Clasificación,

R 10 Xi; R 36/37 N; R 51-53

Etiquetado,

Xi		N	
R: 10-36/37-51/53			
S: (2-)-61			

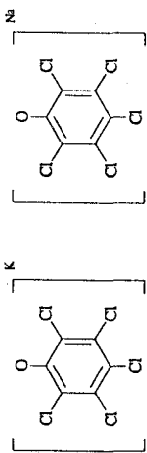
Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xi; R 36/37

Cas No 131-52-2 [1]
7778-73-6 [2]

EC No 205-025-2 [1]
231-911-3 [2]

No 604-003-00-3



ES: pentacloroarseniato de sodio [1]; pentacloroarseniato de potasio [2]; sales alcalinas del pentacloroarsenato

Clasificación,

Carc. Cat. 3; R. 40 T +; R. 26 T; R. 24/25 Xi; R. 36/37/38 N; R. 50-53

Etiquetado,

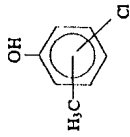
T+ N

R: 24/25-26-36/37/38-40-50/53
S: (1/2)-22-28-36/37-45-52-60-61

Limites de concentración.

Cas No 95-65-8 [1]
95-87-4 [2]
105-67-9 [3]
526-75-0 [4]
576-26-1 [5]
1300-71-6 [6]
71975-58-1 [7]

EC No 202-439-5 [1]
202-461-5 [2]
203-321-6 [3]
208-395-3 [4]
209-400-1 [5]
215-089-3 [6]
276-245-4 [7]



NOTA C

ES: 3,4-xileno [1]; 2,5-xileno [2]; 2,4-xileno [3]; 2,3-xileno [4]; 2,6-xileno [5]; xileno [6]; 2,4(o 2,5)-xileno [7]; xileno

Clasificación,

T: R. 24/25 C. R. 34 N. R. 51-53

Etiquetado,

T N

R: 24/25-34-51/53
S: (1/2)-26-36/37/39-45-61

Limites de concentración.

No 604-006-00-X

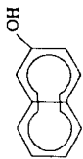
Cas No 135-19-3

EC No 205-182-7

No 604-007-00-5

Cas No 95-57-8 [1]
 106-48-9 [2]
 108-43-0 [3]
 25167-80-0 [4]

EEC No 202-433-2 [1]
 203-402-6 [2]
 203-582-6 [3]
 246-691-4 [4]



ES: 2-nafol

Clasificación,

Xn; R 20/22 N; R 50

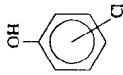
Etiquetado,

Xn N

R: 20/22-50 S: (2)24/25-61

Límites de concentración,

NOTA C



ES: 2-clorofenol [1]; 4-clorofenol [2]; 3-clorofenol [3]; clorofenol [4]

Clasificación,

Xn; R 20/21/22 N; R 51-53

Etiquetado,

Xn N

R: 20/21/22-51/53 S: (2)28-61

Límites de concentración,

Cas No 87-66-1

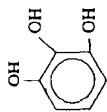
EC No 201-762-9

No 604-009-00-6

Cas No 58-90-2

EC No 200-402-8

No 604-013-00-8



ES: pirogalol

Clasificación,

Muta. Cat. 3; R 40 Xn; R 20/21/22 R 52-53

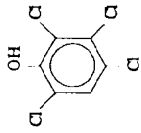
Etiquetado,



R: 20/21/22-40-52/53
S: (2-)36/37-61

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xn; R 20/21/22-40
1 % ≤ C < 10 %	Xn; R 40



ES: 2,3,4,6-tetraclorofenol

Clasificación,

T; R 25 Xi; R 36/38 N; R 50-53

Etiquetado,



R: 25-36/38-50/53
S: (1/2-)26-28-37-45-60-61

Límites de concentración,

C ≥ 20 %	T; R 25-36/38
5 % ≤ C < 20 %	T; R 25
0,5 % ≤ C < 5 %	Xn; R 22

Cas No 98-01-1

EC No 202-627-7

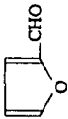
No 605-010-00-4

Cas No 107-22-2

EC No 203-474-9

No 605-016-00-7

NOTA B




ES: 2-furaldehído

Clasificación.

Carc. Cat. 3; R 40 T; R 23/25 Xn; R 21 Xi; R 36/37

Etiquetado.

T 

R: 21-23/25-36/37-40
S: (1/2)-26-36/37/39-43

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	T; R 21-23/25-36/37-40
20 % ≤ C < 25 %	T; R 23/25-36/37-40
5 % ≤ C < 20 %	T; R 23/25-40
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/22-40




ES: glioxal ... %

Clasificación.

Muta. Cat. 3; R 40 Xn; R 20 Xi; R 36/38 R 43

Etiquetado.

Xn 

R: 20-36/38-40-43
S: (2)-36/37

Límites de concentración.

C ≥ 10 %	Xn; R 20-36/38-40-43
1 % ≤ C < 10 %	Xn; R 40-43

Cas No 3066-71-5

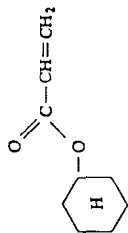
EC No 221-319-3

No 607-116-00-6

Cas No 88-88-0

EC No 201-864-3

No 610-004-00-X



NOTA D

ES: acrilato de ciclohexilo

Clasificación,

Xi; R 37/38 N; R 51-53

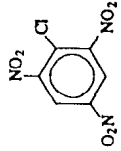
Etiquetado,

Xi N

R: 37/38-51/53
S: (2-6)1

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 37/38



ES: 2-cloro-1,3,5-trinitrobenzeno

Clasificación,

E; R 1 T+; R 26/27/28 N; R 50-53

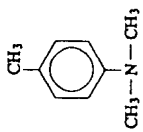
Etiquetado,

E T+ N

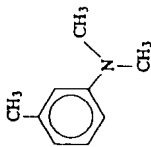
R: 2-26/27/28-50/53
S: (1/2-2)8-35-36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 99-97-8 [1]
121-72-2 [2]
609-72-3 [3]

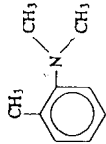


EC No 202-805-4 [1]
204-495-6 [2]
210-199-8 [3]



No 612-056-00-9

NOTA C




ES: N,N-dimetil-p-toluidina [1]; N,N-dimetil-m-toluidina [2]; N,N-dimetil-o-toluidina [3]

Clasificación,

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

Etiquetado,

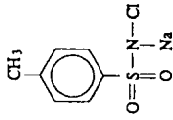
T 

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

Límites de concentración,

C ≥ 5 %	T; R 23/24/25-33
1 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21/22-33

Cas No 127-65-1



EC No 204-854-7


No 616-010-00-9

ES: tosilcloramina sódica

Clasificación,

Xn; R 22 R 31 C; R 34 R 42

Etiquetado,

C 

R: 22-31-34-42
S: (1/2-)/7-22-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 771-29-9

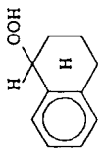
EC No 212-230-0

No 617-004-00-9

Cas No 80-43-3

EC No 201-279-3

No 617-006-00-X



ES: hidropéroxido de 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo

Clasificación,

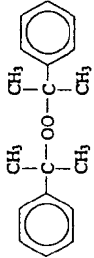
O: R 7 C: R 34 Xn: R 22 N: R 50-53

Etiquetado,

O	C	N
R: 7-22-34-50/53		
S: (1/2-3)/7-14-26-36/37/39-45-60-61		

Límites de concentración,

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



ES: peróxido de bis(α-dimetilbencilo)

Clasificación,

O: R 7 Xi: R 36/38 N: R 51-53

Etiquetado,

O	Xi	N
R: 7-36/38-51/53		
S: (2-3)/7-14-36/37/39-61		

Límites de concentración,

Cas No 14324-55-1

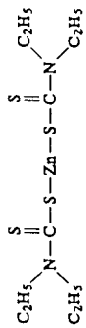
EC No 238-270-9

No 006-082-00-4

Cas No 34681-10-2

EC No 252-139-3

No 006-083-00-X

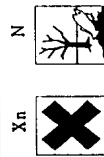


ES: bis(dietilditiocarbamato) de cinc

Clasificación,

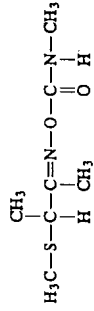
Xn; R 22	Xi; R 36/37/38	R 43	N; R 50-53
----------	----------------	------	------------

Etiquetado,



R: 22-36/37/38-43-50/53
S: (2)-24-37-60-61

Límites de concentración,

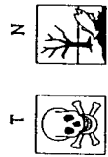


ES: butocarboxim

Clasificación,

R 10	T; R 23/24/25	Xi; R 36	N; R 50-53
------	---------------	----------	------------

Etiquetado,



R: 10-23/24/25-36-50/53
S: (1/2)36/37-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 72490-01-8

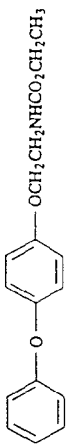
EC No 276-696-7

No 006-086-00-6

Cas No 65907-30-4

EC No 265-974-3

No 006-087-00-1



ES: [2-(4-fenoxifenoxi)etil]carbamato de etilo

Clasificación,

N; R 50-53

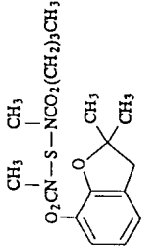
Etiquetado,



R: 50/53

S: 60-61

Límites de concentración,



ES: 2,4-dimetil-6-oxa-5-oro-3-tia-2,4-diazadecanosto de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofurilo

Clasificación,

T+; R 26 T; R 25 Xn; R 48/22 Xi; R 36/38 R 43 N; R 50-53

Etiquetado,

T+



N



R: 25-26-36/38-43-48/22-50/53

S: (1/2)28-36/37-38-45-60-61

Límites de concentración,

Cas No 43509-80-8

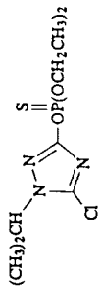
EC No 255-863-8

No 015-153-00-9

Cas No 7727-54-0

EC No 231-786-5

No 016-060-00-6



ES: itiofosfato de O-(5-cloro-1-isopropil-1,2,4-triazol-3-ilo) y de O,O-diétilo

Clasificación,

T+: R 26 T: R 24/25 Xn: R 48/20 R 43 N: R 50-53

Etiquetas,

T+



N



R: 24/25-26-43-48/20-50/53

S: (1/2)28-36/37-38-45-59-61

Límites de concentración,



ES: peroxodisulfato de diamonio

Clasificación,

O: R 8 Xn: R 22 Xi: R 36/37/38 R 42/43

Etiquetas,

O



Xn



R: 8-22-36/37/38-42/43

S: (2)22-24-26-37

Límites de concentración,

Cas No 13820-41-2

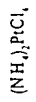
EC No 237-499-1

No 078-002-00-6

Cas No 10026-00-3

EC No 233-051-4

No 078-003-00-1



ES: tetracloroplatinato de diamonio


ES: tetracloroplatinato de disodio



Clasificación, Klassifizierung, Einstufung, Tacivoyan, Classification, Classificazione, Klassifizierung, Indling, Classificazioe, Luokitus, Klassifizering

T; R 25 Xi; R 38-41 R 42/43

Etiquetado,

T 


R: 25-38-41-42/43
S: (2)-22-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Clasificación,

T; R 25 Xi; R 38-41 R 42/43

Etiquetado,

T 

R: 25-38-41-42/43
S: (2)-22-26-36/37/39-45

Límites de concentración,

Cas No 10025-99-7

EC No 233-050-9

No 078-004-00-7

Cas No 78-88-6

EC No 201-153-8

No 602-079-00-2



ES: tetracloroplatinato de dipotasio

Clasificación,

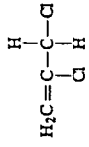
T; R 25 Xi; R 38-41 R 42/43

Etiquetado,



R: 25-38-41-42/43
S: (2-)22-26-36/37/39-45

Límites de concentración,



ES: 2,3-dicloropropeno

Clasificación,

F; R 11 Muta. Cat. 3; R 40 Xn; R 20/21/22 Xi; R 37/38-41 R 52-53

Etiquetado,



R: 11-20/21/22-37/38-40-41-52/53
S: (2-)9-16-23-26-36/37/39-61

Límites de concentración,

Cas No 7085-85-0

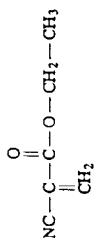
EC No 230-391-5

No 607-236-00-9

Cas No 72850-64-7

EC No 276-942-3

No 607-237-00-4



ES: 2-cianoacrilato de etilo

Clasificación,

Xi; R 36/37/38

Etiquetado,

Xi

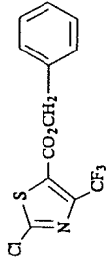


R: 36/37/38

S: (2)-23-24/25-26

Límites de concentración,

C ≥ 10 %	Xi; R 36/37/38



ES: 2-cloro-4-(trifluorometil)iazol-5-carboxilato de bencilo

Clasificación,

N; R 31-53

Etiquetado,

N



R: 51/53

S: 61

Límites de concentración,

Cas No 123-77-3

EC No 204-650-8

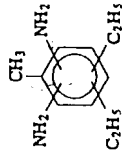
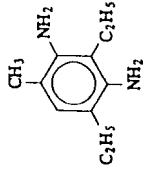
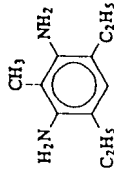
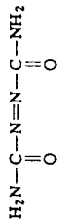
No 611-028-00-3

Cas No 2095-01-4 [1]
2095-02-5 [2]
68479-98-1 [3]

EC No 218-255-3 [1]
218-256-9 [2]
270-877-4 [3]

No 612-130-00-0

NOTA C



ES: C,C'-azodi(formamida)

[1]

[2]

[3]

ES: 2,6-diamino-3,5-dimetiltolueno [1]; 2,4-diamino-3,5-dimetiltolueno [2]; dietilmetilbenzenodiamina [3]

Clasificación,

R 42 R 44

Etiquetado,

Clasificación,

Xn



R: 42-44

S: (2)-(2)-24-37

Límites de concentración,

Xn



N



R: 21/22-36-48/22-50/53

S: (2)-(2)-28-36/37/39-60-61

Límites de concentración,

Cas No 7173-51-5

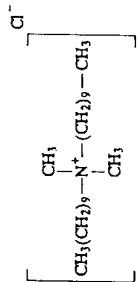
EC No 230-525-2

No 612-131-00-6

Cas No 74-31-7

EC No 200-806-4

No 612-132-00-1

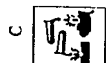


ES: cloruro de didecildimetilamonio

Clasificación,

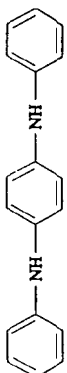
Xn; R 22 C; R 34

Etiquetado,



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

Límites de concentración,



ES: N,N'-difenil-p-fenilendiamina

Clasificación,

R 43 R 52-53

Etiquetado,



R: 43-52/53
S: (2-)24-37-61

Límites de concentración,

Cas No 135-88-6

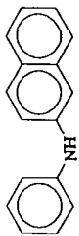
EC No 205-223-9

No 612-135-00-8

Cas No 101-72-4

EC No 202-969-7

No 612-136-00-3

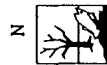


ES: N-2-naftilamina

Clasificación,

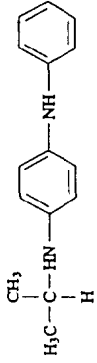
Carc. Cat. 3; R 40 Xi; R 36/38 R 43 N; R 51/53

Etiquetado,



R: 36/38-40-43-51-53
S: (2-)26-36/37-61

Límites de concentración,



ES: N-fenil-N-isopropil-p-fenilendiamina

Clasificación,

Xn; R 22 R 43 N; R 50-53

Etiquetado,



R: 22-43-50/53
S: (2-)24-37-60-61

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 22-43
0,1 % ≤ C < 25 %	Xi; R 43

Cas No 288-88-0

EC No 206-022-9

No 613-111-00-X

Cas No 26530-20-1

EC No 247-761-7

No 613-112-00-5




ES: 1,2,4-triazol

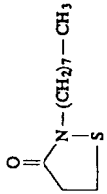
Clasificación,

Repr. Cat. 3; R 63 Xn; R 22 Xi; R 36

Etiquetado,

Xn  R: 22-36-63
S: (2)-36/37

Límites de concentración.





ES: 2-octil-2H-isotiazol-3-ona

Clasificación,

T; R 23/24 Xn; R 22 C; R 34 R 43 N; R 50-53

Etiquetado,

T  N 
R: 22-23/24-34-43-50/53
S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61

Límites de concentración.

C ≥ 25 %	T; R 22-23/24-34-43
10 % ≤ C < 25 %	C; R 20/21-34-43
5 % ≤ C < 10 %	Xn; R 20/21-36/38-43
3 % ≤ C < 5 %	Xn; R 20/21-43
0,05 % ≤ C < 3 %	Xi; R 43

Cas No 102-77-2

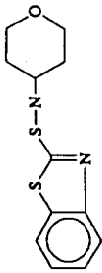
EC No 203-052-4

No 613-113-00-0

Cas No 4719-04-4

EC No 225-208-0

No 613-114-00-6



ES: 2-(morfolinotio)benzotiazol

Clasificación,

Xi; R 36/38 R 43 N; R 51-53

Etiquetado,

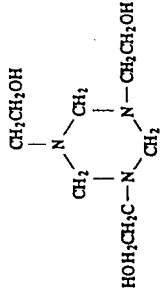
Xi N



R: 36/38-43-51/53

S: (2-)24-26-37-61

Límites de concentración,



ES: 2,2',2''-(hexahidro-1,3,5-triazina-1,3,5-trifil)trietanol

Clasificación,

Xn; R 22 R 43

Etiquetado,

Xn



R: 22-43

S: (2-)24-37

Límites de concentración,

C ≥ 25 %	Xn; R 22-43
0,1 % ≤ C < 25 %	Xi; R 43

Cas No 28434-01-7

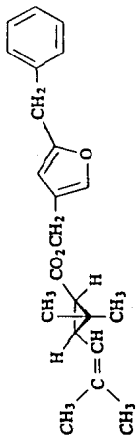
EC No 249-014-0

No 613-120-00-9

Cas No 64902-72-3

EC No 265-268-5

No 613-121-00-4




ES: bioresmetrina

Clasificación,

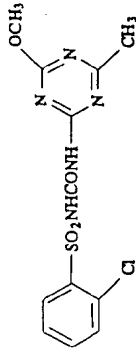
N; R: 50-53

Etiquetado,

N 

R: 50/53
S: 60-61

Límites de concentración,




ES: 2-cloro-N-[[6-metil-4-metoxi-1,3,5-triazin-2-il]amino]carbontil]benzenosulfonamida

Clasificación,

N; R: 50-53

Etiquetado,

N 

R: 50/53
S: 60-61

Límites de concentración,

Cas No 83164-33-4

EC No —

No 616-032-00-9

ANEXO B (Parte I)

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

I. MÉTODO

Este método de cromatografía de permeación sobre gel (CPG) es copia de las directrices TG 118 de la OCDE (1996). Los principios fundamentales y demás información técnica se dan en la referencia 1.

I.1. Introducción

La gran diversidad de las propiedades de los polímeros impide describir un único método que fije precisamente las condiciones de separación y de evaluación que cubran todas las eventualidades y particularidades que se producen en la separación de los polímeros. En particular, es frecuente que los polímeros complejos no puedan someterse a la CPG. En este caso, puede determinarse el peso molecular diferentemente (véase el anexo). Deberán entonces indicarse todos los datos y la justificación del método utilizado.

El método descrito aquí se basa en la norma DIN 55672 (1). Se encontrará en esta norma DIN información precisa sobre la manera de llevar a cabo las pruebas y de evaluar los datos. Cuando sea indispensable introducir modificaciones de las condiciones experimentales, estos cambios deberán justificarse. Se podrán utilizar otras normas con las debidas referencias. El método descrito utiliza para la calibración muestras de poliestireno de polidispersidad conocida y puede ser necesario modificarlo para adaptarlo a algunos polímeros como, por ejemplo, los polímeros solubles en el agua o ramificados de cadena larga.

I.2. Definiciones y unidades

El peso molecular medio en número M_n y el peso molecular medio en peso M_w se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i / M_i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

donde:

H_i es el nivel de la señal del detector a partir de la línea de base para el volumen de retención V_i ,
 M_i es el peso molecular de la fracción polimérica de volumen de retención V_i , y
n es el número de puntos de medición.

La amplitud de la distribución de los pesos moleculares, que caracteriza la dispersidad del sistema, viene dada por la relación M_w/M_n .

I.3. Sustancias de referencia

Como la CPG es un método relativo, es necesario efectuar una calibración. Para eso, se utilizan normalmente patrones de poliestireno de distribución estrecha y estructura lineal cuyos pesos moleculares M_n y M_w se conocen, así como su distribución de pesos moleculares. La curva de calibración sólo puede servir para determinar el peso molecular de la muestra desconocida si las condiciones de separación de la muestra y de los patrones se han seleccionado de manera idéntica.

Clasificación,

R: 52-53

Etiquetado,

R: 52/53

S: 61

Límites de concentración,

ES: difluorcianuro

Una relación determinada entre el peso molecular y el volumen de elución sólo es válida en las condiciones específicas de una experiencia particular. Estas condiciones son, sobre todo, la temperatura, el disolvente (o la mezcla de disolventes), las condiciones de la cromatografía y la columna o sistema de columnas de separación.

Los pesos moleculares de la muestra, determinados de esta manera, son valores relativos y se describen como «pesos moleculares equivalentes de poliestireno». En otros términos, según las diferencias estructurales y químicas entre la muestra y los patrones, los pesos moleculares pueden más o menos desviarse de los valores absolutos. Si se recurre a otros patrones como, por ejemplo, de polietilenglicol, de polioxido de etileno, de polimetacrilato de metilo, de poliácido acrílico, se explicará esta elección.

1.4. Principios del método de ensayo

La distribución de pesos moleculares de la muestra y los pesos moleculares medios (M_w , M_n) pueden determinarse por CPG. La CPG es una cromatografía líquida particular en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de sus componentes (2).

La separación se efectúa mientras que la muestra pasa por una columna rellena de un material poroso, normalmente un gel orgánico. Las moléculas pequeñas consiguen penetrar en los poros, mientras que las gruesas quedan excluidas. El recorrido de las moléculas grandes es, pues, más corto y se eluyen antes. Las moléculas de tamaño medio penetran en algunos poros y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen al final.

En una situación ideal, la separación depende completamente del tamaño de las distintas moléculas, pero en la práctica es difícil evitar la interferencia de al menos algunos efectos de absorción. La situación empeora en caso de relleno irregular de la columna o de volúmenes muertos (2).

Se procede a la detección basándose, por ejemplo, en el índice de refracción o en la absorción UV para llegar a una curva de distribución simple. Sin embargo, para precisar sobre la curva valores efectivos de los pesos moleculares, es necesario calibrar la columna haciendo pasar polímeros de peso molecular conocido y, a ser posible, de estructura globalmente idéntica, por ejemplo, diversos patrones de poliestireno. Resulta de manera característica una curva de Gauss, a veces distorsionada por una pequeña cola hacia el lado de los pesos moleculares bajos; el eje vertical indica la cantidad, en peso, de las especies de distintos pesos moleculares eluidas, y el eje horizontal el logaritmo del peso molecular.

1.5. Criterios de calidad

La repetibilidad (desviación típica relativa: RSD) del volumen de elución deberá sobrepasar el 0,3 %. La repetibilidad requerida del análisis estará garantizada por corrección mediante patrón interno si se evalúa un cromatograma en función del tiempo y no corresponde al criterio previamente mencionado (1). Las polidispersidades dependen de los pesos moleculares de los patrones. En el caso de los patrones de poliestireno, los valores característicos son:

$$\begin{aligned} M_p &< 2.000 & M_w/M_n &< 1,20 \\ 2.000 \leq M_p &\leq 10^4 & M_w/M_n &< 1,05 \\ M_p &> 10^4 & M_w/M_n &< 1,20 \end{aligned}$$

(M_p es el peso molecular del patrón en el máximo del pico)

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. Preparación de las soluciones patrón de poliestireno

Se disuelven los patrones de poliestireno mezclándolos cuidadosamente con el eluyente elegido. Se tendrán en cuenta las recomendaciones del fabricante para la preparación de las soluciones

Las concentraciones de los patrones elegidos dependen de distintos factores como, por ejemplo, el volumen de inyección, la viscosidad de la solución y la sensibilidad del detector analítico. El volumen máximo de inyección debe adaptarse a la longitud de la columna, con el fin de evitar las sobrecargas. Generalmente, los volúmenes inyectados para las separaciones analíticas por CPG en una columna de 30 cm x 7,8 mm se sitúan entre 40 y 100 μ l. Es posible utilizar volúmenes mayores, pero no deben sobrepasar los 250 μ l. La relación óptima entre el volumen de inyección y la concentración debe determinarse antes de la calibración efectiva de la columna.

1.6.2. Preparación de la solución de muestra

En principio, las mismas exigencias se aplican a la preparación de las soluciones de muestras. La muestra se disuelve en un disolvente conveniente como, por ejemplo, tetrahidrofurano (THF), agitando con cuidado. No debe nunca disolverse en baño de ultrasonidos. En caso necesario, la solución de muestra se purifica con un filtro de membrana cuyo tamaño de poro se sitúa entre 0,2 y 2 μ m.

Debe señalarse en el informe final la presencia de partículas no disueltas, puesto que puede tratarse de sustancias de elevado peso molecular. Se utilizará un método conveniente para determinar el porcentaje en peso de partículas no disueltas. Las disoluciones se utilizarán en el plazo de 24 horas.

1.6.3. Equipo

- depósito de disolvente
- desgasificador (en su caso)
- bomba
- amortiguador de pulsaciones (en su caso)
- sistema de inyección
- columnas de cromatografía
- detector
- caudalímetro (en su caso)
- conjunto de registro-tratamiento de los datos
- receptor/culo de residuos

Es necesario garantizar que el sistema de CPG es inerte respecto a los disolventes utilizados (por ejemplo, utilizando capilares de acero para el disolvente THF).

1.6.4. Sistema de inyección y de distribución del disolvente

Un volumen definido de la solución de muestra se pasa a la columna con ayuda de un muestreador automático o bien manualmente, en una zona estrictamente definida. La liberación o la depresión manual demasiado rápida del émbolo de la jeringuilla pueden causar modificaciones en la distribución de pesos moleculares observada. El sistema de distribución del disolvente deberá, en la medida de lo posible, estar libre de pulsaciones, y lo ideal es que incluya un amortiguador de pulsaciones. El caudal es del orden de 1 ml/min.

1.6.5. Columna

Según la muestra, el polímero se caracterizará con ayuda de una columna simple o de varias columnas conectadas en secuencia. Está disponible en el comercio diverso material para columnas porosas, de propiedades definidas (por ejemplo, tamaño de poro, límites de exclusión). La elección del gel de separación o de la longitud de la columna depende tanto de las propiedades de la muestra (volúmenes hidrodinámicos, distribución de los pesos moleculares) como de las condiciones específicas de la separación, como el disolvente, la temperatura y el caudal (1) (2) (3).

1.6.6. Platos teóricos

La columna (o la combinación de columnas) utilizada para la separación debe caracterizarse por el número de platos teóricos. En el caso de tomar el THF como disolvente de elución, es necesario cargar

una solución de etilbenceno u otro soluto homopolar adecuado en una columna de longitud conocida. El número de platos teóricos viene dado por la siguiente ecuación:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_1}{W} \right)^2 \quad \text{o} \quad N = 16 \left(\frac{V_1}{W} \right)^2$$

donde:

- N es el número de platos teóricos
- V₁ es el volumen de elución en el máximo del pico
- W es la anchura del pico en la línea de base
- W_{1/2} es la anchura del pico a la mitad de la altura.

1.6.7. *Capacidad de separación*

Además del número de platos teóricos, cantidad que determina la anchura de la banda, la capacidad de separación desempeña también un papel y está determinada por la pendiente de la curva de calibración. La capacidad de separación de una columna viene dada por la siguiente relación:

$$\frac{V_{1,2M_1} - V_{1,2M_2}}{\text{superficie de la sección transversal de la columna}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

donde:

- V_{1,2M₁} es el volumen de elución de un poliestireno de peso molecular M₁.
- V_{1,2M₂} es el volumen de elución de un poliestireno de peso molecular diez veces superior.

La resolución del sistema se define generalmente del siguiente modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_1 - V_2}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_8(M_2/M_1)}$$

donde:

- V₁, V₂ son los volúmenes de elución de los dos patrones de poliestireno en el máximo del pico
- W₁, W₂ son las anchuras de los picos en la línea de base
- M₁, M₂ son los pesos moleculares en el máximo del pico (deberían diferir en un factor de 10)

El valor R del sistema de columna debería sobrepasar 1,7 (4).

1.6.8. *Disolvente*

Todos los disolventes deben ser de gran pureza (para el THF, se exigirá una pureza del 99,5 %). El depósito de disolvente (en caso necesario, en una atmósfera de gas inerte) debe ser suficientemente grande para la calibración de la columna y varios análisis de muestras. El disolvente debe desgasificarse antes de su transporte a la columna por la bomba.

1.6.9. *Ajuste de la temperatura*

La temperatura de los componentes internos esenciales (circuito de inyección, columnas, detector y conducciones) será constante y en coherencia con la elección del disolvente.

1.6.10. *Detector*

El detector tiene por objeto registrar cuantitativamente la concentración de muestra eluida de la columna. Para evitar el ensanchamiento inútil de los picos, el volumen de la célula del detector debe ser lo más bajo posible. No debería exceder de 10 µl excepto en caso de detectores de dispersión de luz y de viscosidad. La detección se hace generalmente por refractometría diferencial. Sin embargo, si alguna propiedad de la muestra o del disolvente de elución lo impone, se puede recurrir a otros tipos de detectores, como por ejemplo, detectores de UV/visible, IR, viscosidad, etc.

2. **RESULTADOS E INFORMES**

2.1. **Resultados**

Hay que remitirse a la norma DIN (1) respecto al detalle de los criterios de evaluación así como para los imperativos relativos a la recogida y tratamiento de los datos.

De cada muestra, deben realizarse dos experiencias independientes, que será necesaria analizar separadamente.

M₁, M₂, M₁/M₂ y M₂ deben establecerse en cada medición. Es necesario indicar explícitamente que los valores medidos son valores relativos equivalentes a los pesos moleculares de los patrones utilizados.

Después de la determinación de los volúmenes de retención o del tiempo de retención (eventualmente corregidos con ayuda de un patrón interno), los valores log M_i (M_i es el máximo del pico del patrón de calibración) se representan gráficamente en función de una de esas cantidades. Serán necesarios al menos dos puntos de calibración por década de pesos moleculares y al menos cinco puntos de medida para la curva entera, que debe cubrir el peso molecular estimado de la muestra. El peso molecular más bajo de la curva de calibración se define por el n-hexilbenceno u otro soluto homopolar adecuado. La media en número y la media en peso de los pesos moleculares se determinan generalmente por tratamiento informático de los datos, sobre la base de las fórmulas del punto 1.2. En caso de digitalización manual, se puede consultar el documento ASTM D 3536-91 (3).

La curva de distribución debe darse en forma de cuadro o de gráfico (frecuencia diferencial o porcentajes de las sumas frente al log M). Para la representación gráfica, una década de pesos moleculares debería normalmente ocupar unos 4 cm de anchura y el máximo del pico debería encontrarse a unos 8 cm de altura. En el caso de curvas de distribución integral, la diferencia de ordenadas entre 0 y 100 % debería ser de cerca de 10 cm.

2.2. **Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

2.2.1. *Sustancia de ensayo*

- información existente sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas)
- descripción del tratamiento de la muestra, observaciones, problemas.

2.2.2. *Equipo*

- depósito de eluyente, gas inerte, desgasificación del eluyente, composición del eluyente, impurezas
- bomba, amortiguador de pulsaciones, sistema de inyección
- columnas de separación (fabricante, toda la información sobre las características de las columnas como tamaño del poro, naturaleza del material de separación, etc., número, longitud y orden de las columnas utilizadas)

- número de platos teóricos de la columna (o combinación), capacidad de separación (resolución del sistema)
- información sobre la simetría de los picos
- temperatura de la columna, naturaleza del ajuste de la temperatura
- detector (principio de medida, volumen de la célula)
- caudalímetro si se utiliza (fabricante, principio de medida)
- sistema de registro y tratamiento de los datos (material y programas informáticos).

2.2.3. Calibración del sistema

- descripción precisa del método empleado para construir la curva de calibración
- información sobre los criterios de calidad de este método (por ejemplo, coeficiente de correlación, suma de cuadrados de error, etc)
- explicaciones sobre todas las extrapolaciones, hipótesis y aproximaciones hechas durante el procedimiento experimental y la evaluación y tratamiento de los datos
- todas las medidas utilizadas para construir la curva de calibración deben precisarse en un cuadro que incluya la información siguiente de cada punto de calibración:
 - nombre de la muestra
 - fabricante de la muestra
 - valores característicos de los patrones M_n , M_w , M_z , M_w/M_n , proporcionados por el fabricante o derivados de medidas posteriores, junto con precisiones sobre el método de determinación
 - volumen y concentración de inyección
 - valor de M_p utilizado para la calibración
 - volumen de elución o tiempo de retención corregido medido en los máximos de los picos
 - M_p calculado en el máximo de los picos
 - error porcentual del M_p calculado y del valor de calibración.

2.2.4. Evaluación

- evaluación en función del tiempo: métodos utilizados para garantizar la reproducibilidad requerida (método de corrección, patrón interno, etc.)
- información sobre si la evaluación se ha realizado basándose en el volumen de elución o en el tiempo de retención
- información sobre los límites de la evaluación si no se analiza completamente un pico
- descripción de los métodos de suavizado, si se utilizan
- procedimientos de preparación y de tratamiento preliminar de la muestra
- posible presencia de partículas no disueltas
- volumen de inyección (μl) y concentración de inyección (mg/ml)
- observaciones sobre los efectos que llevan a divergencias en relación con el perfil ideal de la CPG
- descripción detallada de todas las modificaciones de los procedimientos de ensayo
- precisiones sobre las gamas de errores
- toda la información y observaciones pertinentes para la interpretación de los resultados.

3. REFERENCIAS

- (1) DIN 53672 (1995). *Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel*. Teil 1.

- (2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D., eds, (1979). *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*. J. Wiley and sons.
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC)*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Anexo

Ejemplos de otros métodos de determinación del peso molecular promedio en número (M_n) de los polímeros

La cromatografía por permeación sobre gel (CPG) es el método de elección para determinar M_n , en particular cuando se dispone de un conjunto de patrones que tienen una estructura comparable a la del polímero. Sin embargo, cuando surgen dificultades prácticas en la utilización de la CPG o si se espera por adelantado que la sustancia no cumpla algún criterio M_n , reglamentario (y que exija confirmación) existen otros métodos, por ejemplo:

1. Utilización de las propiedades coligativas
 - 1.1. *Ebulloscopia/crioscopia*: ponen en juego la medida de la subida del punto de ebullición (ebulloscopia) o del descenso del punto de congelación (crioscopia) de un disolvente, cuando se añade el polímero. El método se basa en el hecho de que el efecto del polímero disuelto sobre el punto de ebullición/congelación del líquido depende del peso molecular del polímero (1) (2).
 - 1.2. *Disensión de la presión de vapor*: pone en juego la medida de la presión de vapor de un líquido de referencia determinado antes y después de la adición de cantidades conocidas de polímero (1) (2).
 - 1.3. *Osmometría de membrana*: se basa en el principio de la ósmosis, es decir, la tendencia natural de las moléculas de disolvente a atravesar una membrana semipermeable desde una solución diluida hacia una solución concentrada para llegar al equilibrio. En el ensayo, la solución diluida tiene una concentración cero, mientras que la solución concentrada contiene el polímero. El efecto del paso del disolvente a través de la membrana causa un diferencial de presión que depende de la concentración y del peso molecular del polímero (1) (3) (4).
 - 1.4. *Osmometría en fase de vapor*: compara la velocidad de evaporación de un aerosol de disolvente puro con al menos tres aerosoles que contiene el polímero a distintas concentraciones (1) (5) (6).
2. Análisis de grupos terminales

Para utilizar este método, es necesario conocer al mismo tiempo la estructura global del polímero y la naturaleza de los grupos terminales de las cadenas (que debe ser distinguible del esqueleto principal por, por ejemplo, RMN o valoración/derivación). La determinación de la concentración molecular de los grupos terminales presentes en el polímero permite determinar un valor del peso molecular (7) (8).

Aplicabilidad, M_n hasta 50 000 (con fiabilidad decreciente).

REFERENCIAS

- (4) Billmeyer, F.W., Jr., (1984). *Textbook of Polymer Science*, 3rd Edn, John Wiley, Nueva York.
- (2) Glover, C.A., (1975). «Absolute Colligative Property Methods». Chapter 4 In: *Polymer Molecular Weights*, Part I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, Nueva York.
- (3) ASTM D 3750-79, (1979). *Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weights of Polymers by Membrane Osmometry*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) Coll, H. (1989). «Membrane Osmometry». In: *Determination of Molecular Weight*, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.
- (5) ASTM 3592-77, (1977). *Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (6) Morris, C.E.M., (1989). «Vapour Pressure Osmometry». In: *Determination of Molecular Weight*, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E., Müller, G., y Arndt, K.-F., (1989). *Polymer Characterisation*. Carl Hanser Verlag, Múnich.
- (8) Garmon, R.G., (1975). «End-Group Determinations», Chapter 3 In: *Polymer Molecular Weights*, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, Nueva York.
- (9) Amiya, S., et al. (1990). *Pure and Applied Chemistry*, 62, 2139-2146.

ANEXO B (Parte II)

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

1. Método

Este método de cromatografía de permeación sobre el gel (CPG) es copia de las directrices IG 119 de la OCDE (1996). Los principios fundamentales y demás información técnica se dan en la referencia 1.

1.1. Introducción

La gran diversidad de las propiedades de los polímeros impide describir un único método que lije precisamente las condiciones de separación y de evaluación que cubran todas las eventualidades y particularidades que se producen en la separación de los polímeros. En particular, es frecuente que los polímeros complejos no puedan someterse a la CPG. En este caso, puede determinarse el peso molecular diferentemente (véase el anexo). Deberán entonces indicarse todos los datos y la justificación del método utilizado.

El método descrito aquí se basa en la norma DIN 55672 (1). Se encontrará en esta norma DIN información precisa sobre la manera de llevar a cabo las pruebas y de evaluar los datos. Cuando sea indispensable introducir modificaciones de las condiciones experimentales, estos cambios deberán justificarse. Se podrán utilizar otras normas con las debidas referencias. El método descrito utiliza para la calibración muestras de poliestireno de polidispersidad conocida y puede ser necesario modificarlo para adaptarlo a algunos polímeros como, por ejemplo, los polímeros solubles en el agua o ramificados de cadena larga.

1.2. Definiciones y unidades

Un peso molecular bajo se define arbitrariamente como un peso molecular por debajo de 1 000 dalton. El peso molecular medio en número M_n y el peso molecular medio en peso M_w se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i / M_i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

donde:

H_i es el nivel de la señal del detector a partir de la línea de base para el volumen de retención V_i ,
 M_i es el peso molecular de la fracción polimérica de volumen de retención V_i , y
 n es el número de puntos de medición.

La amplitud de la distribución de los pesos moleculares, que caracteriza la dispersidad del sistema, viene dada por la relación M_w/M_n .

1.3. Sustancias de referencia

Como la CPG es un método relativo, es necesario efectuar una calibración. Para eso, se utilizan normalmente patrones de poliestireno de distribución estrecha y estructura lineal cuyos pesos moleculares medios M_n y M_w se conocen, así como su distribución de pesos moleculares. La curva de calibración sólo puede servir para determinar el peso molecular de la muestra desconocida si las condiciones de separación de la muestra y de los patrones se han seleccionado de manera idéntica.

Una relación determinada entre el peso molecular y el volumen de elución sólo es válida en las condiciones específicas de una experiencia particular. Estas condiciones son, sobre todo, la temperatura, el disolvente (o la mezcla de disolventes), las condiciones de la cromatografía y la columna o sistema de columnas de separación.

Los pesos moleculares de la muestra, determinados de esta manera, son valores relativos y se describen como «pesos moleculares equivalentes de poliestireno». En otros términos, según las diferencias estructurales y químicas entre la muestra y los patrones, los pesos moleculares pueden más o menos desviarse de los valores absolutos. Si se recurre a otros patrones como, por ejemplo, de polietilenglicol, de polioxido de etileno, de polimetacrilato de metilo, de poliácido acrílico, se explicará esta elección.

1.4. Principios del método de ensayo

La distribución del peso molecular de la muestra y los pesos moleculares medios (M_n y M_w) pueden determinarse por CPG. La CPG es una cromatografía líquida particular en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de sus componentes (2).

La separación se efectúa mientras que la muestra pasa por una columna rellena de un material poroso, normalmente un gel orgánico. Las moléculas pequeñas consiguen penetrar en los poros, mientras que las gruesas quedan excluidas. El recorrido de las moléculas grandes es, pues, más corto y se eluyen antes. Las moléculas de tamaño medio penetran en algunos poros y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen al final.

En una situación ideal, la separación depende completamente del tamaño de las distintas moléculas, pero en la práctica es difícil evitar la interferencia al menos de algunos efectos de absorción. La situación empeora en caso de relleno irregular de la columna o de volúmenes muertos (2).

Se procede a la detección basándose, por ejemplo, en el índice de refracción o en la absorción UV para llegar a una curva de distribución simple. Sin embargo, para precisar sobre la curva valores efectivos de los pesos moleculares, es necesario calibrar la columna haciendo pasar polímeros de peso molecular conocido y, a ser posible, de estructura globalmente idéntica, por ejemplo, diversos patrones de poliestireno. Resulta de manera característica una curva de Gauss, a veces distorsionada por una pequeña cola hacia el lado de los pesos moleculares bajos; el eje vertical indica la cantidad, en peso, de las especies de distintos pesos moleculares eluidas, y el eje horizontal el logaritmo del peso molecular.

El contenido en sustancias de bajo peso molecular se obtiene de esta curva. El cálculo sólo puede ser preciso si las especies de peso molecular bajo responden del mismo modo, en función del peso, que el polímero en su conjunto.

1.5. Criterios de calidad

La repetibilidad (desviación típica relativa: RSD) del volumen de elución deberá sobrepasar el 0,3 %. La repetibilidad requerida del análisis estará garantizada por corrección mediante patrón interno si se evalúa un cromatograma en función del tiempo y no corresponde al criterio previamente mencionado (1). Las polidispersidades dependen de los pesos moleculares de los patrones. En el caso de los patrones de poliestireno, los valores característicos son:

$$\begin{aligned} M_w/M_n &< 2,000 & M_w/M_n &< 1,20 \\ 2,000 \leq M_w &\leq 10^4 & M_w/M_n &< 1,05 \\ M_w &> 10^4 & M_w/M_n &< 1,20 \end{aligned}$$

(M_w es el peso molecular del patrón en el máximo del pico)

1.6. Descripción del método de ensayo

1.6.1. Preparación de las soluciones patrón de poliestireno

Se disuelven los patrones de poliestireno mezclándolos cuidadosamente con el eluyente elegido. Se tendrán en cuenta las recomendaciones del fabricante para la preparación de las soluciones.

Las concentraciones de los patrones elegidos dependen de distintos factores como, por ejemplo el volumen de inyección, la viscosidad de la solución y la sensibilidad del detector analítico. El volumen máximo de inyección debe adaptarse a la longitud de la columna, con el fin de evitar las sobrecargas. Generalmente, los volúmenes inyectados para las separaciones analíticas por CPG en una columna de 30 cm x 7,8 mm se sitúan entre 40 y 100 µl. Es posible utilizar volúmenes mayores, pero no deben sobrepasar 250 µl. La relación óptima entre el volumen de inyección y la concentración debe determinarse antes de la calibración efectiva de la columna.

1.6.2. Preparación de la solución de muestra

En principio, las mismas exigencias se aplican a la preparación de las soluciones de muestras. La muestra se disuelve en un disolvente conveniente como por ejemplo, tetrahidrofurano (THF), agitando con cuidado. No debe nunca disolverse en baño de ultrasonidos. En caso necesario, la solución de muestra se purifica con un filtro de membrana cuyo tamaño de poro se sitúa entre 0,2 y 2 µm.

Debe señalarse en el informe final la presencia de partículas no disueltas, puesto que puede tratarse de sustancias de elevado peso molecular. Se utilizará un método conveniente para determinar el porcentaje en peso de partículas no disueltas. Las disoluciones se utilizarán en el plazo de 24 horas.

1.6.3. Corrección del contenido en impurezas y aditivos

Es generalmente necesario proceder a una corrección del contenido de las sustancias de $M < 1.000$ para tener en cuenta la contribución de los componentes específicos no poliméricos presentes (por ejemplo, impurezas o aditivos), salvo si el contenido medido es ya $< 1\%$. Esto se hace mediante el análisis directo de la solución polimérica o del eluido de la CPG.

Cuando el eluido, después de su paso a través de la columna, está demasiado diluido para el análisis posterior, hay que concentrarlo. Puede ser necesario evaporarlo hasta estado seco para disolverlo de nuevo a continuación. La concentración del eluido debe hacerse en condiciones que garanticen que no sufre ningún cambio. El tratamiento del eluido después de la CPG depende del método analítico utilizado para las determinaciones cuantitativas.

1.6.4. Equipo

La CPG exige el siguiente equipo:

- depósito de disolvente
- desgasificador (en su caso)
- bomba
- amortiguador de pulsaciones (en su caso)
- sistema de inyección
- columnas de cromatografía
- detector
- caudalímetro (en su caso)
- conjunto de registro-tratamiento de los datos
- receptor de residuos

Es necesario garantizar que el sistema de CPG es inerte respecto a los disolventes utilizados (por ejemplo, utilizando capilares de acero para el disolvente THF).

1.6.5. Sistema de inyección y de distribución del disolvente

Un volumen definido de la solución de muestra se pasa a la columna con ayuda de un muestreador automático o bien manualmente, en una zona estrictamente definida. La liberación o la depresión demasiado rápida del émbolo de la jeringuilla pueden causar modificaciones en la distribución de pesos moleculares observada. El sistema de distribución del disolvente deberá, en la medida de lo posible, estar libre de pulsaciones, y lo ideal es que incluya un amortiguador de pulsaciones. El caudal es del orden de 1 ml/min.

1.6.6. Columna

Según la muestra, el polímero se caracterizará con ayuda de una columna simple o de varias columnas conectadas en secuencia. Está disponible en el comercio diverso material para columnas porosas, de propiedades definidas (por ejemplo, tamaño de poro, límites de exclusión). La elección del gel de separación o de la longitud de la columna depende tanto de las propiedades de la muestra (volúmenes hidrodinámicos, distribución de los pesos moleculares) como de las condiciones específicas de la separación, como disolvente, la temperatura y el caudal (1) (2) (3).

1.6.7. *Platos teóricos*

La columna (o la combinación de columnas) utilizada para la separación debe caracterizarse por el número de platos teóricos. En el caso de tomar el THF como disolvente de elución, es necesario cargar una solución de etilbenceno u otro soluto homopolar adecuado en una columna de longitud conocida. El número de platos teóricos viene dado por la siguiente ecuación:

$$N = 5.54 \left(\frac{V}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{o} \quad N = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2$$

donde:

N es el número de platos teóricos

V_c es el volumen de elución en el máximo del pico

W es la anchura del pico en la línea de base

$W_{1/2}$ es la anchura del pico a la mitad de la altura.

1.6.8. *Capacidad de separación*

Además del número de platos teóricos, cantidad que determina la anchura de la banda, la capacidad de separación desempeña también un papel y esta determinada por la pendiente de la curva de calibración. La capacidad de separación de una columna viene dada por la siguiente relación:

$$\frac{V_{c,2} - V_{c,1(M_1)}}{\text{superficie de la sección transversal de la columna}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

donde:

$V_{c,2}$ es el volumen de elución de un poliestireno de peso molecular M_2

$V_{c,1(M_1)}$ es el volumen de elución de un poliestireno de peso molecular diez veces superior.

La resolución del sistema se define generalmente del siguiente modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{c,1} - V_{c,2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

donde:

$V_{c,1}$, $V_{c,2}$ son los volúmenes de elución de los dos patrones de poliestireno en el máximo del pico

W_1 , W_2 son las anchuras de los picos en la línea de base

M_1 , M_2 son los pesos moleculares en el máximo del pico (deberán diferir en un factor de 10)

El valor R del sistema de columna debería sobrepasar 1,7 (4).

1.6.9. *Disolvente*

Todos los disolventes deben ser de gran pureza (para el THF, se exigirá una pureza del 99,5 %). El depósito de disolvente (en caso necesario, en una atmósfera de gas inerte) debe ser suficientemente grande para la calibración de la columna y varios análisis de muestras. El disolvente debe desgasificarse antes de su transporte a la columna por la bomba.

1.6.10. *Ajuste de la temperatura*

La temperatura de los componentes internos esenciales (circuito de inyección, columnas, detector y conducciones) será constante y en coherencia con la elección del disolvente.

1.6.11. *Detector*

De detector tiene por objeto registrar cuantitativamente la concentración de muestra eluida de la columna. Para evitar el ensanchamiento inútil de los picos, el volumen de la célula del detector debe ser lo más bajo posible. No debería exceder de 10 μl excepto en caso de detectores de dispersión de luz y de viscosidad. La detección se hace generalmente por refractometría diferencial. Sin embargo, si alguna propiedad de la muestra o del disolvente de elución impone, se puede recurrir a otros tipos de detectores, como por ejemplo, detectores de UV/visible, IR, viscosidad, etc.

2. **RESULTADOS E INFORMES**2.1. **Datos**

Hay que remitirse a la norma DIN (1) respecto al detalle de los criterios de evaluación así como para los imperativos relativos a la recogida y tratamiento de los datos.

De cada muestra deben realizarse dos experiencias independientes, que se analizarán separadamente. En todos los casos, es absolutamente necesario determinar también los datos procedentes de controles tratados en las mismas condiciones que la muestra.

Es necesario indicar explícitamente que los valores medidos son valores relativos equivalentes a los pesos moleculares del patrón utilizado.

Después de la determinación de los volúmenes de retención o del tiempo de retención (eventualmente corregidos con ayuda de un patrón interno), los valores $\log M_p$ (M_p es el máximo del pico del patrón de calibración) se representan gráficamente en función de una de estas cantidades. Son necesarios al menos dos puntos de calibración por década de pesos moleculares y cinco puntos de medida al menos para la curva entera, que debe cubrir el peso molecular estimado de la muestra. El peso molecular más bajo de la curva de calibración se define con n-hexilbenceno u otro soluto homopolar adecuado. La porción de la curva que corresponde a los pesos moleculares inferiores a 1 000 se determina y se corrige según sea necesario en función de las impurezas y aditivos. Las curvas de elución se evalúan generalmente por tratamiento informático de los datos. Si se procede a una digitalización manual, se puede consultar el documento ASTM D 3536-91 (3).

Si se retiene cualquier polímero insoluble en la columna, su peso molecular será probablemente superior al de la fracción soluble y, si no se tiene en cuenta, conducirá a sobrestimar el contenido en pesos moleculares bajos. El anexo propone principios de corrección del contenido en pesos moleculares bajos en función de los polímeros insolubles.

La curva de distribución debe darse en forma de cuadro o de gráfico (frecuencia diferencial o porcentajes de las sumas frente al $\log M$). Para la representación gráfica, una década de pesos moleculares debería normalmente ocupar unos 4 cm de anchura y el máximo del pico debería encontrarse a unos 8 cm de altura. En el caso de curvas de distribución integral, la diferencia de ordenadas entre 0 y 100 % debería ser de cerca de 10 cm.

2.2. **Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

— información sobre las impurezas, aditivos y otras especies no poliméricas en porcentaje en peso en relación con la muestra total.

2.2.5. Evaluación

- evaluación en función del tiempo: métodos utilizados para garantizar la reproducibilidad requerida (método de corrección, patrón interno, etc.)
- información sobre si la evaluación se ha realizado basándose en el volumen de elución o en el tiempo de retención
- información sobre los límites de la evaluación si no se analiza completamente un pico
- descripción de los métodos de suavizado, si se utilizan
- procedimientos de preparación y de tratamiento preliminar de la muestra
- posible presencia de partículas no disueltas
- volumen de inyección (μ l) y concentración de inyección (mg/ml)
- observaciones sobre los efectos que llevan a divergencias en relación con el perfil ideal de la CPG
- descripción detallada de todas las modificaciones de procedimientos de ensayo
- precisiones sobre las gamas de errores
- toda la información y observaciones pertinentes para la interpretación de los resultados.

3. REFERENCIAS

- (1) DIN 55672 (1995) *Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel*, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., y Bly, D.D. eds, (1979). *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*, J. Wiley and sons.
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC)*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Anexo

Orientaciones para la corrección del contenido en bajos pesos moleculares en presencia de polímeros insolubles

Cuando está presente en una muestra un polímero insoluble, ocasiona una pérdida de masa durante el análisis por CPG. El polímero insoluble se retiene irreversiblemente en la columna o filtro de la muestra mientras que la porción soluble de la muestra pasa a través de la columna. Cuando puede estimarse o medirse el aumento del índice de refracción (dn/dc) del polímero, se puede estimar la pérdida de masa de la muestra en la columna. En este caso, se procede a una corrección mediante calibración externa con materiales patrón de concentraciones y dn/dc conocidas, para calibrar la respuesta del refractómetro. En el siguiente ejemplo, se utiliza un patrón de poli (metilmetacrilato) (PMMA).

En la calibración externa para el análisis de polímeros acrílicos, se analiza por CPG un patrón de PMMA de concentración conocida en tetrahidrofurano y los datos resultantes sirven para establecer la constante del refractómetro según la ecuación:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

2.2.1. Sustancia de ensayo

- información disponible sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas)
- descripción del tratamiento de la muestra, observaciones, problemas.

2.2.2. Equipo

- depósito de eluyente, gas inerte, desgasificación del eluyente, composición del eluyente, impurezas
- bomba, amortiguador de pulsaciones, sistema de inyección
- columnas de separación (fabricante, toda la información sobre las características de las columnas como tamaño del poro, naturaleza del material de separación, etc., número, longitud y orden de las columnas utilizadas)
- número de platos teóricos de la columna (o combinación), capacidad de separación (resolución del sistema)
- información sobre la simetría de los picos
- temperatura de la columna, naturaleza del ajuste de la temperatura
- detector (principio de medida, volumen de la célula)
- caudalímetro si se utiliza (fabricante, principio de medida)
- sistema de registro y tratamiento de los datos (material y programas informáticos).

2.2.3. Calibración del sistema

- descripción precisa del método empleado para construir la curva de calibración
- información sobre los criterios de calidad de este método (por ejemplo, coeficiente de correlación, suma de los cuadrados de los errores, etc.)
- explicaciones sobre todas las extrapolaciones, hipótesis y aproximaciones hechas durante el procedimiento experimental y la evaluación y tratamiento de los datos
- todas las medidas utilizadas para construir la curva de calibración deben precisarse en un cuadro que incluya la información siguiente de cada punto de calibración:

- nombre de la muestra
- fabricante de la muestra
- valores característicos de los patrones M_p , M_w , M_n , M_v , M_z , M_w/M_n , proporcionados por el fabricante o derivados de medidas posteriores, junto con precisiones sobre el método de determinación
- volumen y concentración de inyección
- valor de M_p utilizado para la calibración
- volumen de elución o tiempo de retención corregido medido en los máximos de los picos
- M_p calculado en el máximo del pico
- error porcentual del M_p calculado y del valor de calibración.

2.2.4. Información sobre el contenido en polímeros de bajo peso molecular

- descripción del método utilizado para el análisis y manera de llevar las experiencias
- información sobre el porcentaje de contenido en especies de bajo peso molecular (p/p) en relación con la muestra total

1.5. Descripción del método de ensayo

1.5.1. Equipo

Es necesario el equipo siguiente:

- material de trituración, por ejemplo, triturador que produzca partículas de tamaño conocido
- agitador, con posibilidad de ajuste de la temperatura
- sistema de filtro de membrana
- equipo analítico adecuado
- tamices normalizados.

1.5.2. Preparación de la muestra

En primer lugar, una muestra representativa debe reducirse a partículas de tamaño incluido entre 0,125 y 0,25 mm con ayuda de los tamices convenientes. Puede ser necesario enfriar para garantizar la estabilidad de la muestra o para el proceso de trituración. Los materiales de carácter gomoso pueden triturarse a la temperatura del nitrógeno líquido (1).

Si no se puede llegar al tamaño de partículas requerido, se intentará reducir el tamaño de las partículas en la medida de lo posible y se indicará el resultado. Es necesario que en el informe se indique cómo se ha conservado antes del ensayo la muestra triturada.

1.5.3. Procedimiento

Se pesan tres muestras de 10 g de sustancia de ensayo en cada uno de los tres frascos equipados de tapones de vidrio; se añaden 1 000 ml de agua a cada uno. Si resulta difícil manipular una cantidad de 10 g de polímero, se utilizará la cantidad inmediata superior que pueda manipularse y se ajustará en consecuencia el volumen de agua.

Los frascos se tapan firmemente y se agitan después a 20 °C. El dispositivo utilizado para sacudir o agitar será capaz de funcionar a temperatura constante. Después de 24 h, se centrifuga o filtra el contenido de cada frasco y se determina por un método de análisis conveniente la concentración de polímero en la fase acuosa clara. Si no se dispone de ningún método de análisis adecuado para la fase acuosa, se podrá considerar la solubilidad/extracción total a partir del peso seco del residuo filtrado o del precipitado centrifugado.

Es generalmente necesario diferenciar cuantitativamente las impurezas y aditivos por una parte, y las especies de bajo peso molecular por otra parte. En caso de determinación gravimétrica, es importante también realizar un ensayo en blanco, sin utilizar la sustancia de ensayo, para poder tener en cuenta los residuos derivados del procedimiento experimental.

El comportamiento de disolución/extracción de los polímeros en el agua a 37 °C a pH2 y pH9 puede determinarse como se ha descrito para el experimento a 20 °C. Los valores de pH pueden obtenerse por adición de amortiguadores convenientes o de ácidos o bases adecuados, como ácido clorhídrico, ácido acético, hidróxido de potasio o de sodio de grado analítico, o NH₃.

Según el método de análisis empleado, se procederá a uno o dos ensayos. Cuando se disponga de métodos suficientemente específicos para un análisis directo en la fase acuosa del componente polimérico, bastará con un ensayo tal como se describe arriba. Sin embargo, cuando no se disponga de tales métodos y la determinación del comportamiento de disolución/extracción del polímero se limite a un análisis indirecto que determina solamente el contenido total en carbono orgánico (COT) del extracto acuoso, será necesario efectuar un segundo ensayo. Éste se realizará también por triplicado, con muestras de polímeros diez veces más pequeñas y las mismas cantidades de agua que en el primer ensayo.

donde:

K es la constante del refractómetro (en microvoltios; segundos/ml)

R es la respuesta del patrón de pMMA (en microvoltios; segundos)

C es la concentración del patrón de pMMA (en mg/ml)

V es el volumen de inyección (en ml) y

dn/dc es el aumento del índice de refracción del pMMA en tetrahidrofurano (en ml/mg).

El patrón de pMMA presenta los siguientes datos característicos:

R = 2.937.891

C = 1.07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

El valor K resultante $3,05 \times 10^{11}$, se utiliza entonces para calcular la respuesta teórica del detector si el 100 % del polímero inyectado eluye a través del detector.

ANEXO B (Parte III)

A.20. COMPORTAMIENTO DE DISOLUCIÓN/EXTRACCIÓN

1. MÉTODO

El método descrito es copia de la versión revisada del documento TG 120 de la OCDE (1997). Se encontrará más información técnica en la referencia 1.

1.1. Introducción

Para algunos polímeros como los polímeros emulsionados, puede ser necesario un trabajo preparatorio antes de que pueda aplicarse el método indicado. El método no es aplicable a los polímeros líquidos ni a los que reaccionan con el agua en las condiciones del ensayo.

Cuando el proceso es poco práctico o inaplicable, el comportamiento de disolución/extracción se puede estudiar por medio de otros métodos. Deberán entonces indicarse los detalles y la justificación del método empleado.

1.2. Sustancias de referencia

Ninguna.

1.3. Principio del método de ensayo

El comportamiento de disolución/extracción de los polímeros en medio acuoso se determina con ayuda del método de frasco (véase A.6. Hidrosolubilidad, método de frasco) con las modificaciones siguientes.

1.4. Criterios de calidad

Ninguno.

polímero (normalmente en mg/g). Además, se indicará también la pérdida de peso de la muestra (calculada como el peso de soluto dividido por el peso de la muestra inicial). Se calculará la desviación típica relativa (RSD). Se darán cifras individuales de la sustancia total (polímero + aditivos esenciales, etc.) y del polímero solo (es decir, después de sustracción de la participación de estos aditivos).

2.2. Ensayo realizado con dos tamaños diferentes de muestras
Se darán los valores de COT individuales de los extractos acuosos de las dos experiencias por triplicado y el valor medio de cada experiencia, en unidades de masa por volumen de solución (normalmente en mg C/l), así como en unidades de masa por peso de la muestra inicial (normalmente en mg C/g).

Si no hay diferencia entre los resultados con elevada proporción muestra/agua y con baja proporción muestra/agua, se podría suponer que todos los componentes, susceptibles de extraerse se han extraído realmente. En este caso, el análisis directo no sería necesario en principio.

Se darán los pesos individuales de los residuos y se expresarán en porcentaje de los pesos iniciales de las muestras. Las medias se calcularán para cada experiencia. Las diferencias entre 100 y los porcentajes encontrados representan los porcentajes de materiales solubles y extraíbles en la muestra original.

3. INFORME

3.1 Informe del ensayo

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

3.1.1 Sustancia de ensayo

— información disponible sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas, contenido en especies de bajo peso molecular).

3.1.2. Condiciones experimentales

— descripción de los procedimientos utilizados y de las condiciones experimentales
— descripción de los métodos de análisis y de detección.

3.1.3 Resultados

— resultados de solubilidad/extractividad en mg/l; valores individuales y medios para los ensayos de extracción en las distintas soluciones, desglose del contenido en polímeros e impurezas, aditivos, etc.

— resultados de solubilidad/extractividad en mg/g de polímero

— valores de COT de los extractos acuosos, peso del soluto y porcentajes calculados, si se miden
— pH de cada muestra

— información sobre los valores en blanco

— en caso necesario, referencias a la inestabilidad química de la sustancia de ensayo, tanto durante el procedimiento de ensayo como durante los análisis

— toda la información importante para la interpretación de los resultados.

4. REFERENCIAS

(1) DIN 53733 (1976) *Zerkleinerung von Kunststoffproben für Prüfzwecke*.

1.5.4. Análisis

1.5.4.1. Ensayo realizado con un único tamaño de muestra

Se dispondrá quizá de métodos de análisis directo de los componentes poliméricos en la fase acuosa. Si no, se podrá considerar también un análisis indirecto de los componentes poliméricos disueltos/extraídos determinando el contenido total de las partes solubles y aportando las correcciones necesarias que tendrán en cuenta los componentes no específicamente poliméricos.

Se puede proceder al análisis del conjunto de las especies poliméricas de la fase acuosa:

con ayuda de un método suficientemente sensible como, por ejemplo:

- COT, con digestión por persulfato o bicromato para liberar CO₂, seguida de una estimación por IR o análisis químico
- espectrometría de absorción atómica (AAS) o su equivalente de emisión de plasma acoplado por inducción (ICP) para polímeros que contienen silicio o metales
- absorción UV o espectrofluorimetría para los polímeros arílicos
- espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS) para las muestras de bajo peso molecular;
- o por evaporación al vacío hasta estado seco del extracto acuoso y análisis espectroscópico (IR, UV, etc.) o análisis AAS/ICP del residuo.

Si el análisis de la fase acuosa como tal no es realizable, el extracto acuoso se someterá a extracción con ayuda de un disolvente orgánico inmiscible con el agua, por ejemplo, un hidrocarburo clorado. El disolvente se evapora a continuación y el residuo se analiza como se indica arriba para determinar su contenido en el polímero correspondiente. Todos los componentes de este residuo indentificados como impurezas o aditivos deben restarse para determinar el grado de disolución/extracción del propio polímero.

Cuando estén presentes cantidades relativamente importantes de estos materiales, puede ser necesario someter los residuos a un análisis por CLAR o CG, por ejemplo, para diferenciar las impurezas presentes de las especies monoméricas y derivadas de los monómeros, de modo que pueda determinarse el contenido auténtico de estas últimas.

En algunos casos, pueden bastar la simple evaporación del disolvente orgánico hasta el estado seco y el peso del residuo seco.

1.5.4.2. Ensayo realizado con dos tamaños de muestras diferentes

El COT se analizará en todos los extractos acuosos.

Se procederá a una determinación por gravimetría de la parte no disuelta/no extraída de la muestra. Si después de centrifugación o filtrado del contenido de cada frasco, sigue habiendo residuos poliméricos pegados a las paredes de éste, se enjuagará con el filtrado hasta que el frasco quede libre de todos los residuos visibles. Luego se filtrará o se centrifugará de nuevo el filtrado. Los residuos que permanezcan sobre el filtro o en el tubo de centrifugación se secan a 40 °C al vacío y se pesan. La operación de secado se prolonga hasta llegar a un peso constante.

2. RESULTADOS

2.1. Ensayo realizado con un único tamaño de muestra

Se darán los resultados individuales de cada uno de los tres frascos y los valores medios, expresados en unidades de masa por volumen de solución (normalmente en mg/l) o de masa por masa de muestra de

ANEXO B (Parte IV)

C.1.3 BIOCONCENTRACIÓN: ENSAYO DINAMICO CON PECES

1. MÉTODO

El presente método de bioconcentración reproduce las directrices de la OCDE TG 305 (1996).

1.1. Introducción

El presente método describe un procedimiento para caracterizar el potencial de bioconcentración de algunas sustancias en peces en condiciones dinámicas. Son preferibles los regímenes de ensayos dinámicos, pero los regímenes semiestáticos son también aceptables en la medida en que se satisfagan los criterios de validez.

El método da toda la información necesaria para la ejecución del ensayo pero deja libertad suficiente para la adaptación del diseño experimental a las condiciones específicas de cada laboratorio y para variar las características de las sustancias de ensayo. Conviene especialmente a los productos orgánicos estables cuyos valores de $\log P_{ow}$ están entre 1,5 y 6,0 (1) pero también es aplicable a las sustancias superlipofílicas ($\log P_{ow} > 6,0$). Para estas últimas, el valor estimado del factor de bioconcentración (FBC), a veces denominado K_p , será probablemente superior al valor del factor de bioconcentración en estado de equilibrio (FBC_{eq}) que se puede esperar en un experimento de laboratorio. Pueden calcularse valores estimados del factor de bioconcentración de los productos orgánicos cuyos valores de $\log P_{ow}$ lleguen hasta alrededor de 9,0 con ayuda de la ecuación de Bintein et al. (2). El potencial de bioconcentración se caracteriza por algunos parámetros, como la constante de la velocidad de absorción (k_1), la constante de la velocidad de depuración (k_2) y el FBC_{ss}.

Puede facilitarse el análisis de las muestras de agua y de peces con ayuda de sustancias de ensayo radiomarcadas, que pueden también servir para definir si se deben identificar y cuantificar las sustancias degradadas. Si se miden los residuos radiactivos totales (por ejemplo, por combustión o disolución de los tejidos), el FBC se basará en el compuesto de origen, todos los metabolitos retenidos y el carbono asimilado. El FBC basado en los residuos radiactivos totales puede, entonces, no ser directamente comparable a un FBC derivado de un análisis químico específico exclusivamente del compuesto de origen.

Se podrán aplicar procedimientos de limpieza en los estudios radiomarcados para determinar el FBC sobre la base del compuesto de origen; los principales metabolitos se determinarán si se considera necesario. Es posible también combinar un estudio del metabolismo de los peces con un estudio de bioconcentración por análisis e identificación de los residuos en los tejidos orgánicos y órganos.

1.2. Definiciones y unidades

Bioconcentración/bioacumulación: es el aumento de la concentración de la sustancia de ensayo en el interior o en la superficie de un organismo (en tejidos específicos de éste) en relación con la concentración de esta sustancia en el medio ambiente.

Factor de bioconcentración (FBC o K_p): en cualquier momento durante la fase de absorción de este ensayo de acumulación es la concentración de la sustancia de ensayo en el pez, o en tejidos determinados de éste, [C_p , expresada en $\mu\text{g}/\text{g}$ (ppm)] dividida por la concentración de la sustancia en el medio ambiente [C_w , expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm)].

Factor de bioconcentración en estado de equilibrio (FBC_{eq} o K_{pw}): no cambia notablemente durante un plazo de tiempo prolongado, al ser constante la concentración de la sustancia de ensayo en el medio ambiente durante este mismo período.

Mezeta o estado de equilibrio: en la representación gráfica de la concentración de sustancia de ensayo en el pez (C_p) en función del tiempo, se alcanza cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos de C_p realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del $\pm 20\%$ entre sí, y no hay diferencias significativas entre los tres períodos de muestreo. Cuando se analizan muestras puestas conjuntamente, es necesario proceder al menos a cuatro análisis sucesivos. Si las sustancias de ensayo son absorbidas con lentitud, se optará preferiblemente por intervalos semanales.

Factores de bioconcentración: calculados directamente a partir de las constantes cinéticas (k_1/k_2) se llaman factores de concentración cinéticos, FBC_c.

Coefficiente de reparto octanol-agua (P_{ow}): es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio (método A.8); también se denomina K_{ow} . El logaritmo de P_{ow} indica el potencial de bioconcentración de una sustancia por los organismos acuáticos.

Fase de exposición o de absorción: es el tiempo durante el cual se exponen los peces a la sustancia de ensayo.

Constante de velocidad de absorción (k_1): es el valor numérico que define la velocidad de aumento de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces del ensayo (o en tejidos específicos de estos) cuando se expone a esta sustancia (k_1 se expresa en días^{-1}).

Fase de post-exposición o de depuración (pérdida): es el tiempo, tras la transferencia de los peces de un medio que contiene la sustancia de ensayo a un medio libre de ésta, durante el cual se estudia la depuración (o pérdida neta) de la sustancia a partir de los peces del ensayo (o de los tejidos específicos).

Constante de velocidad de depuración (pérdida) (k_2): es el valor numérico que define la velocidad de disminución de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces del ensayo (o en tejidos específicos) tras su transferencia de un medio que contiene la sustancia de ensayo a un medio que esta libre de ella (k_2 se expresa en días^{-1}).

Principio del método

El ensayo se divide en dos fases: la de exposición (absorción) y la de post-exposición (depuración). Durante la fase de absorción, se exponen grupos distintos de peces de una sola especie a al menos dos concentraciones de la sustancia de ensayo. Luego se transfieren a un medio libre de esta sustancia, para la fase de depuración. Esta última es siempre necesaria, excepto cuando la absorción de la sustancia durante la fase de absorción es poco importante (por ejemplo, si el FBC es inferior a 10). La concentración de la sustancia de ensayo en los peces (o tejidos específicos) se mide durante las dos fases del ensayo. Además de las dos concentraciones de ensayo, se mantiene un grupo testigo de peces en condiciones idénticas, salvo que no se exponen a la sustancia de ensayo. Esto sirve para relacionar los posibles efectos nocivos observados en el ensayo de bioconcentración con un grupo testigo correspondiente, y deducir las concentraciones de fondo de la sustancia de ensayo.

La fase de absorción dura 28 días salvo si se demuestra que el equilibrio se alcanza antes. Puede preverse la duración de la fase de absorción y el tiempo necesario para la obtención del estado de equilibrio gracias a la ecuación del anexo 3. El período de depuración comienza entonces con la transferencia de los peces a otro recipiente limpio que contiene el mismo medio, pero esta vez sin la sustancia de ensayo. Cuando sea posible, se calculará el factor de bioconcentración preferiblemente como relación entre (FBC_{ss}) de la concentración en los peces (C_p) y en el agua (C_w) en el estado de equilibrio aparente y también como factor de bioconcentración cinético, FBC_c, que es la relación entre las constantes de velocidad de absorción (k_1) y de depuración (k_2), suponiendo una cinética de primer orden. Si es evidente que no se sigue una cinética de primer orden, deberán aplicarse modelos más complejos (véase el anexo 5).

Si no se llega a un estado de equilibrio en el plazo de 28 días, la fase de absorción se prolongará hasta alcanzar este estado de equilibrio, o durante 60 días si esto supone un plazo menor; luego comenzará la fase de depuración.

Compuestos de referencia

La utilización de compuestos de referencia con un potencial de bioconcentración conocido podrá ayudar al control del procedimiento experimental, en caso necesario. No se puede aún, sin embargo, recomendar ninguna sustancia específica.

1.7 Descripción del método

1.7.1. Equipo

Se tendrá cuidado de evitar los materiales que puedan presentar fenómenos de disolución, sorción o lixiviación o tener algún efecto adverso sobre los peces, y esto en todas las partes del equipo. Se utilizarán tanques normales rectangulares o cilíndricos, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adaptada a la tasa de carga. Se reducirá al mínimo el uso de tubos de plástico flexible. Serán preferibles los tubos de teflón (R), acero inoxidable o vidrio. La experiencia pone de manifiesto que para las sustancias que presentan fuertes coeficientes de adsorción, como los pterotroides sintéticos por ejemplo, pudiera ser necesario el vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados.

1.7.2. Agua

Se utiliza generalmente para el ensayo en agua natural procedente de una fuente no contaminada y de calidad uniforme. El agua de dilución debe ser tal que permita la supervivencia de la especie de la especie de peces elegida, durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan ningún comportamiento ni aspecto anormales. Idealmente, se debería demostrar que las especies sometidas al ensayo pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en el agua de dilución (por ejemplo, mediante cría en laboratorio o un estudio de toxicidad sobre un ciclo biológico). El agua se caracterizará al menos por su pH, dureza, materia sólida total, carbono orgánico total y también, preferentemente, su contenido en amoníaco y en nitratos, su alcalinidad y, para las especies marinas, su salinidad. Se conocen perfectamente los parámetros importantes para el bienestar óptimo de los peces, pero el anexo 1 indica las concentraciones máximas recomendadas de una serie de parámetros relativos al agua de ensayo, dulce y salada.

Durante toda la duración de un ensayo, el agua tendrá calidad constante. El pH se mantendrá entre 6,0 y 8,5, pero durante un ensayo dado permanecerá dentro de una gama de $\pm 0,5$ unidades de pH. Para garantizar que el agua de dilución no influye indebidamente en los resultados del estudio (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo) ni afecta negativamente al comportamiento de las poblaciones de peces, se tomarán regularmente muestras para análisis. Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, convendrá proceder, por ejemplo cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, estos análisis podrán ser menos frecuentes y sus intervalos más espaciados (por ejemplo, cada seis meses).

El contenido en partículas naturales así como el carbono orgánico total (COT) del agua de dilución será lo más bajo posible para evitar la adsorción de la sustancia de ensayo en la materia orgánica, lo que podría reducir su biodisponibilidad (4). El valor máximo admisible es de 5 mg/l para las partículas (materia seca que no atraviesa un filtro de 0,45 μ m) y 2 mg/l para el carbono orgánico total (véase el anexo 1). En caso necesario, el agua se filtrará antes de usarse. La aportación de los peces (excretas) y los residuos alimentarios al contenido del agua en carbono orgánico deberá ser lo más baja posible. A lo largo del ensayo, la concentración de carbono orgánico en el recipiente del ensayo no deberá sobrepasar en más de 10 mg/l ($\pm 20\%$) la del carbono orgánico procedente de la sustancia de ensayo y, en su caso del agente de disolución.

La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de depuración (pérdida) (o las constantes, cuando entren en juego modelos más complejos), el factor de bioconcentración y, si es posible, los intervalos de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir del modelo que describa mejor las concentraciones medidas de la sustancia de ensayo en los peces y en el agua.

El FBC se expresa en función del peso total húmedo de los peces. Sin embargo, para algunos estudios pueden utilizarse tejidos u órganos específicos (por ejemplo, músculos, hígado) si los peces son suficientemente grandes o si es posible separar las partes comestibles (filetes) y no comestibles (visceras). Como hay una clara relación entre el potencial de bioconcentración y la lipofilia de numerosas sustancias orgánicas, también hay una relación correspondiente entre el contenido en lípidos de los peces del ensayo y las bioconcentraciones observadas de estas sustancias. Así pues, para reducir esta fuente de variabilidad en los resultados de los ensayos relativos a las sustancias con fuerte lipofilia (es decir, con $\log P_{ow} > 3$), la bioconcentración debe expresarse en función del contenido lipídico, además del peso corporal total.

El contenido lipídico se establecerá, si es posible, con los mismos materiales biológicos que se utilicen para determinar la concentración de la sustancia de ensayo.

1.4. Información sobre la sustancia de ensayo

Antes de emprender el ensayo de bioconcentración, deberán reunirse los datos siguientes respecto a la sustancia de ensayo:

- solubilidad en el agua;
- coeficiente de reparto octanol-agua P_{ow} (denominado también K_{ow} , determinado por un método de CLAR en A.8);
- hidrólisis;
- características de fototransformación en el agua bajo irradiación solar natural o artificial y en las condiciones de irradiación del ensayo de bioconcentración (3);
- tensión superficial (para las sustancias cuyo $\log P_{ow}$ no pueda determinarse);
- presión de vapor;
- biodegradabilidad «fácil» (en su caso).

Será necesario también conocer la toxicidad relativa a la especie de peces utilizada en el ensayo, preferiblemente la CL_{50} asintótica (es decir, independiente del tiempo). Es indispensable disponer de un método analítico correcto, de una exactitud, de una precisión y de una sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia de ensayo en las soluciones de ensayo y en el material biológico, así como de datos precisos sobre la preparación y la conservación de las muestras. Es necesario también conocer el límite de detección analítica de la sustancia de ensayo tanto en el agua como en los tejidos de los peces. Si se utiliza una sustancia de ensayo marcada con ¹⁴C, deberá conocerse el porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

1.5. Condiciones de validez del ensayo

Para que un ensayo sea válido, deberán darse las condiciones siguientes:

- la variación de temperatura será inferior a $\pm 2^\circ\text{C}$,
- la concentración de oxígeno disuelto no caerá por debajo del 60 % del nivel de saturación,
- la concentración de la sustancia de ensayo en los recipientes o armarios se mantendrá en la banda del $\pm 20\%$ de la media de los valores medidos durante la fase de absorción,
- la mortalidad y otros efectos adversos o enfermedades tanto entre los peces testigo como entre los tratados serán inferiores al 10 % al final del ensayo; cuando el ensayo se prolongue a lo largo de varias semanas o meses, la mortalidad y los otros efectos adversos en los dos conjuntos de peces deberán ser inferiores al 5 % al mes y no exceder del 30 % en total.

1.7.3. Soluciones de ensayo

Se prepara una solución madre de la sustancia de ensayo, a una concentración adecuada. La solución madre será preparada preferiblemente por simple mezcla o agitación de la sustancia de ensayo en el agua de dilución. No se recomienda la utilización de disolventes o de dispersantes (agentes de disolución) se puede recurrir a ellos, sin embargo, en algunos casos para obtener una solución madre de la concentración necesaria. Los disolventes que pueden utilizarse son el etanol, el metanol, el éter monometílico de etilenglicol, el éter dimetílico de etilenglicol, la dimetilformamida y el trietilenglicol. Los dispersantes utilizables son Cremaphor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCOI-40. Se tomarán precauciones en caso de utilización de agentes fácilmente biodegradables, ya que estos pueden causar problemas de crecimiento bacteriano en los ensayos dinámicos. La sustancia de ensayo puede ir radiomarcada y deberá ser del nivel más alto de pureza (por ejemplo, preferiblemente > 98 %).

Para los ensayos dinámicos, un equipo aportará y diluirá continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional, sistema saturador) para conseguir las concentraciones de ensayo en los recipientes. Será preferible prever al menos cinco volúmenes de sustitución al día para cada recipiente de ensayo. Se preferirá el método dinámico, pero en caso de imposibilidad (por ejemplo, cuando los organismos del ensayo sufran efectos adversos) podrá aplicarse una técnica semistática si siguen cumpliéndose los criterios de validez. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución se controlarán 48 horas antes del ensayo y luego al menos diariamente durante este. Este control incluirá la determinación del flujo en cada recipiente de ensayo y garantizará que dicho flujo no varía en más del 20 % dentro de cada recipiente ni entre recipientes distintos.

1.7.4. Selección de las especies

Entre los criterios importantes de selección de las especies figuran el que sean de fácil disponibilidad, que puedan obtenerse de los tamaños adecuados y que puedan mantenerse satisfactoriamente en el laboratorio. Otros criterios de selección de las especies de peces son su importancia recreativa, comercial o ecológica, así como una sensibilidad comparable, haber producido buenos resultados anteriormente, etc.

En el anexo 2 figura una lista de especies recomendadas para los ensayos. Pueden utilizarse otras especies pero es posible entonces tener que adaptar el procedimiento de ensayo para obtener condiciones experimentales convenientes. En tal caso se expondrá la motivación de la elección de las especies y el método experimental elegido.

1.7.5. Mantenimiento de los peces

Es necesario aclimatar la población de peces durante dos semanas al menos en agua a la temperatura del ensayo y aportar una cantidad de comida suficiente y del mismo tipo que se vaya a utilizar durante el ensayo.

Después de un período de adaptación de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

- mortalidad superior al 10 % de la población en siete días: se rechaza el lote entero,
- mortalidad entre el 5 y el 10 % de la población en siete días: se prolonga la aclimatación durante siete días más,
- mortalidad inferior al 5 % de la población en siete días: se acepta el lote; si la mortalidad sobrepasa el 5 % durante los siete días siguientes, se rechaza el lote entero.

Hay que asegurarse de que los peces utilizados para los ensayos no presentan enfermedades ni anomalías observables. Se descartan todos los peces enfermos. Los peces no deben recibir tratamiento contra ninguna enfermedad durante las dos semanas que preceden al ensayo ni durante éste.

1.8. Realización del ensayo

1.8.1. Ensayo preliminar

Puede ser útil proceder a una experimentación preliminar para optimizar las condiciones de realización del ensayo definitivo, como, por ejemplo, la selección de las concentraciones de la sustancia de ensayo o la duración de las fases de absorción y de depuración.

1.8.2. Condiciones de exposición

1.8.2.1. Duración de la fase de absorción

Se puede prever la duración de la fase de absorción basándose en la experiencia práctica (por ejemplo, a partir de un estudio previo o de un producto químico que tenga propiedades similares de acumulación) o a partir de algunas relaciones empíricas fundadas en el conocimiento de la solubilidad en el agua o de coeficiente de reparto octanol/agua de la sustancia de ensayo (véase el anexo 3).

La fase de absorción durará 28 días salvo si puede demostrarse que se alcanza antes el equilibrio. Si no se llega al estado de equilibrio en el plazo de 28 días, se prolongará la fase de absorción y se procederá a otras mediciones hasta conseguir el estado de equilibrio, o durante 60 días si esto supone un plazo menor.

1.8.2.2. Duración de la fase de depuración

La mitad de la duración de la fase de absorción es generalmente suficiente para que se produzca una reducción conveniente (por ejemplo, 95 %) de la carga corporal de la sustancia de ensayo (véanse las explicaciones del cálculo en el anexo 3). Si el tiempo necesario para llegar a una pérdida del 95 % es excesivamente largo, sobrepasando por ejemplo dos veces la duración normal de la fase de absorción (es decir, más de 56 días), se podrá utilizar un período más corto (hasta que la concentración de la sustancia de ensayo sea inferior al 10 % de la concentración en el estado de equilibrio). Sin embargo, para las sustancias con propiedades de absorción y depuración más complejas que el modelo de peces con un único compartimento, que da una cinética de primer orden, se aplicarán fases de depuración más largas para determinar las constantes de la velocidad de pérdida. Sin embargo, este plazo de tiempo puede regirse por el período durante el cual la concentración de la sustancia de ensayo en los peces permanece por encima del límite de detección analítico.

1.8.2.3. Número de peces del ensayo

El número de peces por concentración del ensayo debe elegirse de modo que, como mínimo, se disponga de cuatro peces por muestra en cada muestreo. Si se desea una estadística más fina, deberá aumentar el número de peces por muestra.

Si se utilizan peces adultos, hay que indicar si son machos o hembras o si se utilizan los dos sexos en el experimento. En este último caso, antes de empezar la exposición, será necesario comprobar que no son significativas las diferencias de contenido lipídico entre sexos; podrá ser necesario reunir todos los machos y todas las hembras.

En todos los ensayos se elegirán peces de peso similar, de modo que el peso del más pequeño no sea inferior a dos tercios del peso del mayor. Pertenecerán a la misma clase de edad y procederán de la misma fuente. Dado que, al parecer, el peso y la edad de un pez tienen a veces efectos notables sobre los valores de FBC (1), estos datos se registrarán con precisión. Se recomienda pesar una submuestra de la población de peces antes del ensayo, para calcular el peso medio.

1.8.2.4. Carga

Se utiliza una relación elevada agua/peces con el fin de minimizar la reducción de C_p debida a la introducción de los peces al principio del ensayo, y también para evitar el descenso de la concentración de oxígeno disuelto. Es importante que la tasa de carga sea adaptada a la especie utilizada para el

ensayo. De todos modos, se recomienda una tasa de carga de 0,1-1,0 g de peces (peso húmedo) por litro de agua al día. Se pueden realizar cargas de tasa elevada si se demuestra que la concentración requerida de sustancia de ensayo puede mantenerse en la banda del $\pm 20\%$, y que la concentración de oxígeno disuelto no cae por debajo del 60% del nivel de saturación.

Se tendrá en cuenta el hábitat normal de la especie de peces al elegir la tasa de carga. Los peces bentónicos, por ejemplo, pueden necesitar un acuario que tenga más superficie de fondo que las especies pelágicas, para un mismo volumen de agua.

1.8.2.5. Alimentación

Durante los períodos de aclimatación y de ensayo, se alimentará a los peces con una dieta conveniente que tenga un contenido conocido en lípidos y proteínas totales, en cantidades suficientes para mantenerlos en buena salud y conservar el peso corporal. Se alimentará a los peces diariamente durante los períodos de aclimatación y de ensayo en la proporción de alrededor del 1 o 2% del peso corporal cada día; se mantiene así en la mayoría de las especies una concentración lipídica de un nivel relativamente constante durante el ensayo. La cantidad de comida deberá volver a calcularse una vez por semana, por ejemplo, con el fin de mantener constantes el peso corporal y el contenido lipídico. Para ese cálculo, el peso de los peces de cada recinto de ensayo se evaluará a partir del peso de los peces muestreados últimamente en ese recinto. No hay que pesar los peces que permanecen en el recinto.

La comida no consumida y los excrementos son evacuados de los recipientes de ensayo mediante sifón cada día poco después de la alimentación (30 minutos a una hora). Los recipientes se tendrán lo más limpios posible a lo largo del ensayo de modo que la concentración de materia orgánica permanezca al nivel más bajo posible, puesto que la presencia de carbono orgánico puede limitar la biodisponibilidad de la sustancia de ensayo (1).

Como muchos alimentos son derivados de harinas de pescado, se analizarán para determinar su contenido en sustancia de ensayo. Es conveniente también analizar el contenido de estos alimentos en plaguicidas y metales pesados.

1.8.2.6. Iluminación y temperatura

El período de iluminación es generalmente de 12 a 16 horas y la temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$) corresponderá a la especie utilizada (véase el anexo 2). Se definirán claramente el tipo y las características de la iluminación. Será necesario prestar atención a la posible fototransformación de la sustancia de ensayo en las condiciones de irradiación del estudio. Se utilizará un alumbrado adecuado que no exponga a los peces a fotoproductos no naturales. En algunos casos, puede ser conveniente utilizar un filtro para eliminar los rayos UV por debajo de 290 nm.

1.8.2.7. Concentraciones del ensayo

Se exponen los peces en condiciones dinámicas a dos concentraciones al menos de la sustancia de ensayo en agua. Normalmente, la concentración más alta de la sustancia de ensayo será del 1% de su CL_{10} aguda asintótica, y al menos diez veces superior a su límite de detección en el agua por el método de análisis elegido.

La concentración más alta del ensayo puede establecerse también dividiendo la CL_{10} a 96 horas por una relación adecuada aguda/crónica (las relaciones adecuadas de algunos productos químicos pueden ir de 3 a 100). Si es posible, la otra u otras concentraciones deben elegirse de modo que la diferencia con la antes citada alcance un factor de diez. En caso de imposibilidad debido al criterio del 1% de la CL_{10} y del límite analítico, podrá utilizarse un factor inferior a diez o se pensará en el uso de una sustancia radiomarcada con ^{14}C . Ninguna concentración podrá superar la solubilidad en agua de la sustancia de ensayo.

Cuando se utilice un agente de disolución, su concentración no deberá sobrepasar 0,1 ml/l y deberá ser idéntica en todos los recipientes del ensayo. Debe conocerse su contribución, junto con la de la sustancia de ensayo, al contenido global de carbono orgánico en el agua del ensayo. Sin embargo, se hará todo lo posible para evitar recurrir a este tipo de materiales.

1.8.2.8. Controles

Se utilizará un control (testigo) del agua de dilución o, en su caso, un control con el agente de disolución, además de la serie de ensayo, en la medida en que se haya establecido que el agente no tiene ningún efecto sobre los peces. En caso contrario, se establecerán ambos controles.

1.8.3. Frecuencia de las medidas de la calidad del agua

Durante el ensayo se medirán en todos los recipientes el oxígeno disuelto, el COT, el pH y la temperatura. La dureza total, y la salinidad eventualmente, se medirán en los controles y en un recipiente que contenga la concentración más alta. Por lo menos, el oxígeno disuelto y eventualmente la salinidad se medirán tres veces —al principio, hacia el medio y al final de período de absorción— y una vez por semana durante el período de depuración. El COT se medirá al principio del ensayo (24 y 48 horas antes del comienzo de la fase de absorción), antes de la adición de los peces y al menos una vez por semana durante los períodos de absorción y de depuración. La temperatura se medirá diariamente, el pH al principio y al final de cada período y la dureza una vez en cada ensayo. La temperatura se medirá preferiblemente de forma continua en un recipiente al menos.

1.8.4. Muestreo y análisis de los peces y del agua

1.8.4.1. Calendario de muestreo de los peces y del agua

Se tomará agua de los recipientes de ensayo para determinar la concentración de la sustancia de ensayo antes de la introducción de los peces y durante las fases de absorción y de depuración. Por lo menos, el agua se tomará al mismo tiempo que los peces y antes de darles de comer. Durante la fase de absorción, se determinarán las concentraciones de sustancia de ensayo para comprobar que satisfacen los criterios de validez.

Se muestrearán los peces en cinco ocasiones al menos durante la fase de absorción y en cuatro ocasiones al menos durante la fase de depuración. Como a veces es difícil calcular una estimación razonablemente precisa del FBC a partir de este número de muestras, en particular cuando hay una cinética de depuración distinta de la simple de primer orden, puede ser recomendable muestrear con mayor frecuencia en los dos períodos (véase el anexo 4). Las muestras suplementarias se conservarán y analizarán solamente si los resultados de la primera serie de análisis se revelan insuficientes para el cálculo del FBC con la precisión requerida.

En el anexo 4 se encuentra un ejemplo de calendario de muestreo aceptable. Pueden establecerse otros calendarios fácilmente sobre la base de otros valores supuestos del P_{95} para calcular el tiempo de exposición que corresponde a una absorción del 95%.

Se prosigue el muestreo durante la fase de absorción hasta el establecimiento de un estado de equilibrio o durante 28 días, si esto supone un plazo menor. Si no se llega a un estado de equilibrio en 28 días, el muestreo continúa hasta la obtención de un estado de equilibrio o durante 60 días, si esto supone un plazo menor. Antes de empezar la fase de depuración, se trasladan los peces a los tanques limpios.

1.8.4.2. Muestreo y preparación de las muestras

Se toman las muestras de agua destinadas a los análisis, por ejemplo mediante sifonado a través de un tubo inerte desde un punto central del recinto de ensayo. Puesto que parece que no siempre se puede separar ni por centrifugación ni por filtración la fracción no biodisponible de la sustancia de ensayo de la que es biodisponible (en particular en el caso de los productos químicos superlipofílicos, es decir, que tienen un $\log P_{ow} > 5$) (1) (5), las muestras pueden no someterse a estos tratamientos.

En su lugar, será necesario procurar que los tanques se mantengan lo más limpios posible y que el contenido en carbono orgánico total se mida a lo largo de las fases de absorción y de depuración.

Se toma un número conveniente de peces (normalmente cuatro como mínimo) de cada recipiente de ensayo en cada momento de muestreo. Los peces tomados se lavan rápidamente con agua, se secan con material absorbente, y se sacrifican instantáneamente de la manera más adecuada e incruentosa posible, y luego se pesan.

Es preferible analizar los peces y el agua inmediatamente después del muestreo para evitar toda degradación u otras pérdidas y para calcular aproximadamente las tasas de absorción y de depuración mientras el ensayo continúa. El análisis inmediato evita también retrasos en la determinación del momento en que se alcanza una meseta.

A falta de un análisis inmediato, las muestras se conservan según un método conveniente. Antes del principio del estudio, se reunirá información sobre el método de conservación adecuado de la sustancia de ensayo correspondiente como, por ejemplo, congelación, mantenimiento a 4 °C, duración de la conservación, extracción, etc.

1.8.4.3. Calidad del método analítico

Como la totalidad del procedimiento se regula principalmente por la exactitud, la precisión y la sensibilidad del método analítico utilizado para la sustancia de ensayo, es necesario controlar experimentalmente que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia de ensayo tanto en el agua como en los peces son satisfactorias en el método particular. Ha de comprobarse también que la sustancia de ensayo no es detectable en el agua de dilución utilizada.

En caso necesario, los valores de C_0 y C_1 derivados de los ensayos se corregirán a la luz de los valores de recuperación y de fondo de los controles. Las muestras de peces y de agua se maneja permanentemente para minimizar las contaminaciones y las pérdidas (derivadas, por ejemplo de la adsorción por el equipo de muestreo).

1.8.4.4. Análisis de los peces muestreados

Si se utilizan para el ensayo materiales radiomarcados, se puede analizar el marcado radiactivo total (es decir, compuestos de origen y metabolitos) o se pueden purificar las muestras de modo que sea posible analizar separadamente los compuestos de origen. Por otro lado, los principales metabolitos pueden caracterizarse en el estado de equilibrio al final de la fase de absorción, si esto supone un plazo menor. Si el FBC en términos de residuos radiomarcados totales es $\geq 1\ 000\ \%$, puede ser bueno (y, para algunas categorías de productos químicos como los plaguicidas, muy recomendable), identificar y cuantificar los productos de degradación que representen $\geq 10\ \%$ de los residuos totales en los tejidos de los peces en el estado de equilibrio. Si estos productos que representan $\geq 10\ \%$ de los residuos totales radiomarcados en los tejidos de peces se identifican y cuantifican, se recomienda entonces identificarlos y cuantificarlos también en el agua del ensayo.

La concentración de la sustancia de ensayo debería generalmente determinarse en cada pez pesado aparte. Si eso no es posible, se podrán poner conjuntamente las muestras en cada muestreo, pero esta mezcla limita los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si se desean un procedimiento y una potencia estadísticos, convendrá entonces utilizar en el ensayo un número adecuado de peces para conciliar el procedimiento de mezcla con la precisión estadística deseada (6) (7).

El FBC se expresará en función del peso húmedo total y también, en caso de sustancias muy lipofílicas, en función del contenido lipídico. El contenido lipídico de los peces se determina si es posible en cada muestreo. Se utilizarán métodos adaptados para determinar el contenido en lípidos (referencias 8 y 2 del anexo 3). Se puede recomendar la técnica de extracción por cloroformo/metanol como método normal (9). Los diversos métodos no dan valores idénticos (10), por lo que es

importante precisar bien el método utilizado. El análisis de los lípidos se hará, si es posible, con el mismo extracto que el consagrado al análisis de la sustancia de ensayo, puesto que los lípidos deben a menudo retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía. El contenido lipídico de los peces (en mg/kg de peso húmedo) al final del experimento no debería separarse de la del principio en más del $\pm 25\ \%$. El porcentaje en sólidos de los tejidos también se indicará para permitir la conversión de la concentración lipídica de peso húmedo a la de peso seco.

2. DATOS

2.1. Tratamiento de los resultados

La curva de absorción de la sustancia de ensayo se obtiene representando su concentración en los peces (o tejidos específicos) durante la fase de absorción en función del tiempo, con una escala aritmética. Si la curva alcanza una meseta, es decir, adopta aproximadamente una disposición asintótica al eje del tiempo, se calculará del siguiente modo el FBC₃₅ en el estado de equilibrio:

$$\frac{C_1 \text{ en estado de equilibrio (media)}}{C_0 \text{ en estado de equilibrio (media)}}$$

Cuando no se llega a ningún estado de equilibrio, es posible calcular un FBC₃₅ de una precisión suficiente para la evaluación de los riesgos a partir de un «estado de equilibrio» al 80 % ($1,6/k_1$) o 95 % ($3,0/k_1$) del equilibrio.

También se determina el factor de concentración (FBC_c) como la relación de k_1/k_2 , las dos constantes cinéticas de primer orden. La constante de la velocidad de depuración (k_2) se determina generalmente a partir de la curva de depuración (es decir, representación de la disminución de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces en función del tiempo). La constante de la velocidad de absorción (k_1) se calcula entonces en función de k_2 y de un valor de C_0 derivado de la curva de absorción (véase también el anexo 5). El método de elección para obtener FBC_c y las constantes de velocidad k_1 y k_2 es recurrir a métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales (11). Alternativamente, se pueden utilizar métodos gráficos para calcular k_1 y k_2 . Si la curva de depuración es evidentemente de orden distinto del primero, entonces convendrá utilizar modelos más complejos (véanse las referencias en el anexo 3) y buscar el consejo de un bioestadístico.

2.2. Interpretación de los resultados

Los resultados se interpretarán con precaución cuando las concentraciones medidas de las soluciones de ensayo se encuentren a niveles cercanos al límite de detección del método de análisis.

La claridad de definición de las curvas de absorción y de pérdida indican la buena calidad de los datos de bioconcentración. La variación de las constantes de absorción/depuración entre las dos concentraciones de ensayo debería ser inferior al 20 %. Las diferencias notables observadas en las velocidades de absorción/depuración entre las dos concentraciones de ensayo se registrarán y explicarán si es posible. En general el límite de confianza del FBC se acerca al $\pm 20\ \%$ en los estudios bien diseñados.

3. INFORME

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

3.1. Sustancia de ensayo

- naturaleza física y, en su caso, propiedades físico-químicas,
- datos de identificación química (incluido el contenido en carbono orgánico, si procede),
- en caso de marcado radiactivo, posición precisa de los átomos marcados y porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

3.2. Especies utilizadas

- Denominación científica, estirpe, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, rango de tamaños, etc.

3.3. Condiciones del ensayo

- procedimiento seguido (por ejemplo, dinámico o semiestático).
- tipo y características del alumbrado utilizado y periodos de iluminación.
- diseño del ensayo (por ejemplo, número y tamaño de los recipientes de ensayo, régimen de sustitución de los volúmenes de agua, número de grupos y de peces por grupo, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y depuración, frecuencia de los muestreos de peces y de agua).
- método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (se indicarán el agente de disolución, su concentración y su contribución al contenido en carbono orgánico del agua del ensayo, en su caso).
- las concentraciones de ensayo nominales, las medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo y su método de obtención.
- fuente del agua de dilución, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de las posibles demostraciones de la aptitud de los peces utilizados para vivir en esta agua y características de ésta: pH, dureza, temperatura, concentración en oxígeno disuelto, niveles de cloro residual (si se mide), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (en su caso), y todas las demás medidas realizadas.
- calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, dureza, COT, temperatura y concentración en oxígeno disuelto.
- información precisa sobre la alimentación (por ejemplo tipo de comida, fuente, composición —al menos contenido en lípidos y proteínas si es posible— cantidad dada y frecuencia).
- información sobre el tratamiento de las muestras de peces y de agua, incluidos datos de preparación, almacenamiento, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia de ensayo y del contenido en lípidos (si se mide).

3.4. Resultados

- resultados de los eventuales estudios preliminares efectuados.
- mortalidad de los peces de control y de los peces de cada recinto de ensayo y todos los comportamientos anormales observados.
- contenido lipídico de los peces (si se determina con motivo del ensayo).
- curvas (con todos los datos medidos) que muestren la absorción y la depuración de las sustancias de ensayo en los peces, el tiempo de acceso al estado de equilibrio.
- C_t y C_w (con desviación típica y gama, en su caso) en el momento de cada muestreo [C_t expresado en $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo (ppm) de todo el animal o de algunos de sus tejidos, por ejemplo lípidos, y C_w en $\mu\text{g/ml}$ (ppm)] valores de C_w de la serie de control (indicar también la concentración de fondo).
- factor de bioconcentración en el estado de equilibrio (FBC_{95}) o factor de concentración cinético (FBC_t) y, en su caso, límites de confianza del 95 % de las constantes de la velocidad de absorción y de depuración (pérdida) todo expresado respecto al cuerpo entero y al contenido total en lípidos, si se mide, del animal (o de sus tejidos especificados), límites de confianza y desviación típica (si se dispone de ella), métodos de cálculo/análisis de los datos para cada concentración de sustancia de ensayo utilizada.
- cuando se utilicen sustancias radiomarcadas, podrá exponerse la acumulación de todos los metabolitos detectados si es necesario.

- toda observación inusual relativa al ensayo, toda divergencia respecto a estos procedimientos y toda la información pertinente.

Minimizar los resultados no detectado al límite de detección mediante la aplicación de un método de ensayo preliminar y el diseño experimental, puesto que estos resultados son inutilizables para los cálculos de las constantes de velocidad.

REFERENCIAS

- (1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, pp. 117-156.
- (2) Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). *Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research*, 1, 29-390.
- (3) OECD, París (1996). *Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety guidance document series on Testing and Assessment of Chemicals No 3.*
- (4) Kristensen P. (1991). *Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods: influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals.* Water Quality Institute, Denmark.
- (5) US EPA 822-R-94-002 (1994) *Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors.* July 1994.
- (6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. *Plagucide analytical manual*, 1, 5600 Fisher's Lane Rockville, MD 20852, July 1975.
- (7) US EPA (1974). Section 5, A(1). *Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Plagucide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- (8) Compaan H. (1980) en *The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation*, Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.
- (9) Gardner et al. (1995). *Limn. & Oceanogr.* 30, 1099-1105.
- (10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). *Evaluation of selected lipid methods for normalizing pollutant bioaccumulation.* *Envir. Toxicol. Chem.* 10, pp. 1431-1436.
- (11) CEC. *Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring test programme, 1984-1985. Final report March 1987.* Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- (12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) *Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.*

Anexo 1

Características químicas aceptables del agua de dilución

	Substancia	Límite de concentración
1	Materia en suspensión	5 mg/l
2	Carbono orgánico total	2 mg/l
3	Amoniaco no ionizado	1 µg/l
4	Cloro residual	10 µg/l
5	Plaguicidas organofosforados totales	50 ng/l
6	Plaguicidas organoclorados totales más policlorobifenilos	50 ng/l
7	Cloro orgánico total	25 ng/l
8	Aluminio	1 µg/l
9	Arsénico	1 µg/l
10	Cromo	1 µg/l
11	Cobalto	1 µg/l
12	Cobre	1 µg/l
13	Hierro	1 µg/l
14	Plomo	1 µg/l
15	Níquel	1 µg/l
16	Cinc	1 µg/l
17	Cadmio	100 ng/l
18	Mercurio	100 ng/l
19	Plata	100 ng/l

Anexo 2

Especies de peces recomendadas para los ensayos

	Especies recomendadas	Gamas de temperaturas recomendadas para los ensayos (en °C)	Longitud total recomendada de los animales utilizados (en cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Hamilton-Buchanan) pez cebra	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Rafinesque) pez cabeza gorda	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus) carpa común	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Temminck y Schlegel) medaka	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Peters) guppy	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (<i>Teleostei, Centrarchidae</i>) (Rafinesque) agallas azules	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (<i>Teleostei, Salmonidae</i>) (Walbaum) trucha arco iris	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (<i>Teleostei, Gasterosteidae</i>) (Linnaeus) espinoso	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Ori G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B, Vol. 252, p. 231.

Se han utilizado distintas especies marinas y de estuarios en algunos países como, por ejemplo:

Leiostomus xanthurus
Cyprinodon variegatus
Menidia beryllina
Gymnogaster aggregata
Parophrys vetulus
Leptocottus armatus
Gasterosteus aculeatus
Dicentrarchus labrax
Alburnus alburnus

Aprovisionamiento

Los peces de agua dulce enumerados en el cuadro anterior son fáciles de criar o están fácilmente disponibles a lo largo del año, mientras que la disponibilidad de las especies marinas o de estuario se limita en parte a los países correspondientes. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en laboratorio, en condiciones donde las enfermedades y los parásitos están bajo control; los animales utilizados serán, pues, sanos y de origen conocido. Estos peces se encuentran en muchas partes del mundo.

A título indicativo, la duración óptima estadísticamente de la fase de absorción que permite obtener datos estadísticamente aceptables (FBC) es el periodo necesario para que la curva del logaritmo de la concentración de la sustancia de ensayo en el pez representado frente al tiempo lineal, llegue a su punto medio, $1.6/k_2$, o un 80 % del estado de equilibrio, pero sin sobrepasar $3.0/k_2$, o un 95 % del estado de equilibrio (7).

El tiempo para llegar al 80 % del estado de equilibrio es (ecuación 4):

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{o} \quad t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad \text{(ecuación 5)}$$

Del mismo modo, para un 95 % del estado de equilibrio:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2} \quad \text{(ecuación 6)}$$

Por ejemplo, la duración de la fase de absorción (abs.) de una sustancia de ensayo que tenga un $\log P_{sw} = 4$ sería (con las ecuaciones 1, 5 y 6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0.414(4) + 1.47 & k_2 &= 0.652 \text{ días}^{-1} \\ \text{abs. (80 \%)} &= 1.6/0.652, \text{ es decir, } 2.45 \text{ días (59 horas)} \\ \text{o abs. (95 \%)} &= 3.0/0.652, \text{ es decir, } 4.60 \text{ días (110 horas)} \end{aligned}$$

Del mismo modo, para una sustancia de ensayo con $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ [$\log(s) = -5.0$], la duración de la absorción sería (ecuaciones 1, 2, 5 y 6):

$$\begin{aligned} \log_{10}(P_{sw}) &= -0.862(-5.0) + 0.710 = 5.02 \\ \log_{10} k_2 &= -0.414(5.02) + 1.47 \\ k_2 &= 0.246 \text{ días}^{-1} \\ \text{abs. (80 \%)} &= 1.6/0.246, \text{ es decir, } 6.5 \text{ días (156 horas)} \\ \text{o abs. (95 \%)} &= 3.0/0.246, \text{ es decir, } 12.2 \text{ días (293 horas)} \end{aligned}$$

Se utiliza, como alternativa, la expresión:

$$t_{95} = 6.54 \times 10^{-3} P_{sw} + 55.31 \text{ (horas)}$$

para calcular el tiempo de llegada al estado de equilibrio efectivo (4).

2. *Previsión de la duración de la fase de depuración*

Se podrá también prever el tiempo necesario para que la carga corporal se reduzca a un determinado porcentaje de la concentración inicial gracias a la ecuación general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden) (1) (8).

Para la fase de depuración, C_w se supone nulo. La ecuación puede reducirse a:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{o} \quad C_f = C_{f0} e^{-k_2 t}$$

donde C_{f0} es la concentración al principio del periodo de depuración. Se llegará a una depuración del 50 % en el tiempo (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{o} \quad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

Del mismo modo, el 95 % de depuración se alcanzará en el tiempo:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

Anexo 3

Previsión de la duración de las fases de absorción y de depuración

1. *Previsión de la duración de la fase de absorción*

Antes de realizar el ensayo, podrá obtenerse una estimación de k_2 y, en consecuencia, un porcentaje del tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, a partir de relaciones empíricas entre k_2 y el coeficiente de reparto n-octanol/agua (P_{ow}) o k_2 y la solubilidad en el agua (s).

Se puede estimar k_2 (días⁻¹), por ejemplo a partir de la relación empírica siguiente (1):

$$\log_{10} k_2 = -0.414 \log_{10}(P_{ow}) + 1.47 \quad (r^2 = 0.955) \quad \text{(ecuación 1)}$$

Para las otras relaciones, véase la referencia (2).

Si el coeficiente de reparto (P_{ow}) es desconocido, se procederá a una estimación (3) a partir de la solubilidad de la sustancia en el agua según:

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0.862 \log_{10}(s) + 0.710 \quad (r^2 = 0.994) \quad \text{(ecuación 2)}$$

donde s = solubilidad (moles/l): (n = 36).

Estas relaciones sólo se aplican a los productos químicos cuyos valores de $\log P_{ow}$ se sitúan entre 2 y 6,5 (4).

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede obtenerse, aplicando la estimación de k_2 , de la ecuación cinética general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f$$

o, si C_w es constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{(ecuación 3)}$$

Cuando se acerca el estado de equilibrio ($t \rightarrow \infty$), la ecuación 3 puede reducirse (5) (6) a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{o} \quad C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{FBC}$$

La relación $k_1/k_2 \cdot C_w$ se acerca entonces a la concentración en el pez en el estado de equilibrio (C_{f0}).

La ecuación 3 puede así transcribirse:

$$C_f = C_{f0} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{o} \quad \frac{C_f}{C_{f0}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{(ecuación 4)}$$

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede preverse aplicando la ecuación 4, cuando k_2 se estima con ayuda de las ecuaciones 1 o 2.

Anexo 4

Ejemplos teóricos de calendarios de muestreo para los ensayos de bioconcentración de sustancias con $\log P_{ow} = 4$

Muestras de peces	Calendario de muestreo			Número de peces por muestra
	Frecuencia mínima requerida (días)	Muestras suplementarias	Número de muestra	
Fase de absorción	- 1 0		2 (*) 2	añadir 45-90 peces
1*	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2*	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3*	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4*	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5*	4,7		2	6
Fase de depuración				Transferir los peces a agua libre del producto de ensayo
6*	5,0	5,3		4 (4)
7*	5,9	7,0		4 (4)
8*	9,3	11,2		4 (4)
9*	14,0	17,5		6 (4)

(*) Tomar el agua después de transferir al menos 3 volúmenes de recinto.

Los valores entre paréntesis son los números de muestras (agua, peces) que se toman si se procede a un muestreo suplementario.

Nota: La estimación antes del ensayo de k_1 para un $\log P_{ow}$ de 4.0 es de $0,652 \text{ días}^{-1}$. La duración total de la experiencia se fija en: $3 \times \text{abs.} = 3 \times 4,6 \text{ días}$, o sea 14 días. Remitirse al anexo 3 para el cálculo de 'abs'.

Si se utiliza el 80 % de la absorción para el primer periodo (1,6/ k_1) y el 95 % de pérdida en la fase de depuración (3,0/ k_2), entonces la fase de depuración será aproximadamente el doble de la depuración de la fase de absorción.

Es importante, sin embargo, tener en cuenta que estas estimaciones se basan en la hipótesis de que los esquemas de absorción y de depuración siguen una cinética de primer orden. Si es evidente que no se cumple esta condición, deberán emplearse modelos más complejos (por ejemplo la referencia 1).

Referencias

- Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) *Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish*. Environ. Toxicol. and Ch. 1, pp. 309-320.
- Kristensen P. (1991) *Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals*. Danish Water Quality Institute.
- Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982). *Partitioning of organic compounds in octanol-water systems*. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.
- Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). *Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish*. Wat. Res. 22 (6), pp. 701-707.
- Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pp. 785-792.
- Ernst W. (1985). *Accumulation in Aquatic Organisms*. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehan P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, pp. 243-255. SCOPE, 1985. John Wiley & Sons Ltd, N.Y.
- Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauehoff M.W. (1977). *Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models*, Can. J. Chem. Eng. 55, pp. 614-622.
- Konemann H. and Van Leeuwen K. (1980). *Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six Chlorobenzenes by Guppies*. Chemosphere, 9, pp. 3-19.

Anexo 5

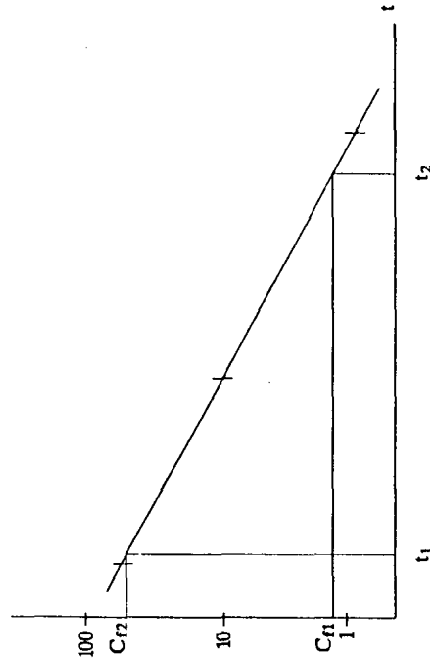
Discriminación de los modelos

Se supone que la mayoría de los datos de bioconcentración se describen «razonablemente» bien con un modelo simple de dos compartimentos/dos parámetros, según indica la curva rectilínea que une aproximadamente los puntos de las concentraciones medidas en los peces durante la fase de depuración, cuando se representan sobre papel semilogarítmico (cuando estos puntos no pueden unirse con una recta, conviene recurrir a modelos más complejos; ver, por ejemplo, Spacie and Hamelink, referencia 1 en el anexo 3).

Método gráfico de determinación de la constante de la velocidad de depuración (pérdida) k_2

Llevar sobre papel semilogarítmico la concentración de la sustancia de ensayo encontrada en cada muestra de peces, frente al tiempo de muestreo. La pendiente de esta recta es k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{t_1}/C_{t_2})}{t_2 - t_1}$$



Atención: las divergencias en relación con esta línea recta pueden indicar un régimen de depuración más complejo que una cinética de primer orden. Puede aplicarse un método gráfico para solucionar los tipos de depuración que se desvían de la cinética de primer orden.

Método gráfico de determinación de la constante de la velocidad de absorción k_1

Dada K_2 , se calcula k_1 del modo siguiente:

$$k_1 = \frac{C_1 k_2}{C_0 \times (1 - e^{-k_2 t_1})} \tag{ecuación 1}$$

Se lee el valor de C_1 en el punto medio de la curva de absorción suavizada obtenida con los datos cuando se representa la concentración logarítmica frente al tiempo (en escala aritmética).

Método de cálculo informático de las constantes de las velocidades de absorción y de depuración (pérdida)

Para obtener el factor de bioconcentración y las constantes de velocidad k_1 y k_2 se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales. Estos programas establecen los valores de k_1 y de k_2 en función de un conjunto de datos secuenciales de concentración en el tiempo y del modelo:

$$C_t = C_0 \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \tag{ecuación 2}$$

$$C_t = C_0 \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_1 (t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \tag{ecuación 3}$$

donde t_c = tiempo al final de la fase de absorción.

Este proceso desemboca en una estimación de la desviación típica para k_1 y k_2 .

Puesto que k_2 puede estimarse en la mayoría de los casos a partir de la curva de depuración con una precisión relativamente grande, y puesto que existe una fuerte correlación entre los dos parámetros k_1 y k_2 , si se estiman simultáneamente, puede ser deseable calcular en primer lugar k_2 a partir de los datos de depuración solamente, y luego calcular k_1 a partir de los datos de absorción con ayuda de una regresión no lineal.